



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**  
Unidad Cuajimalpa



Escuela de  
Ingeniería y Arquitectura  
**Universidad Zaragoza**



# **Caracterización del cultivo en semicontinuo de la microalga oleaginosa *Scenedesmus obtusiusculus***

TESIS

Que para obtener la doble titulación de

**Master en Energía Renovables y Eficiencia Energética y  
Master de Ingeniería de Procesos Industriales**

Presenta

**Pierre-Louis GORRY**

Directora de tesis

**Dra. Marcia Morales Ibarría.**

Abril de 2015

Autor: Pierre-Louis GORRY

Ingeniería de Procesos Industriales – Especialización Térmica y Energética –  
Université de Technologie de Compiègne (UTC), Compiègne, FRANCIA

Master en Energía Renovables y Eficiencia Energética  
Escuela de Ingeniería y Arquitectura (EINA), Universidad de Zaragoza, Zaragoza,  
ESPAÑA

DNI (EINA): 684999

Director de tesis: Dra. Marcia MORALES IBARRÍA

Ponente EINA: Francisco MORENO

Semestre de Otoño 2014 – Práctica del 27 de Octubre 2014 al 15 Abril 2015

## Agradecimientos

Agradezco a mi familia por su apoyo y motivación.

Agradezco a la Dra Marcia Morales por haberme dado la oportunidad y la confianza para realizar mi práctica para mi tesis. Por sus observaciones para ser mejor.

Agradezco la Universidad de Zaragoza y la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa por haber sido posible la realización de mi tesis. Agradezco a mi asesor, el profesor Francisco Moreno Gómez por sus consejos y apoyo.

Agradezco los amigos de la planta piloto, y de los otros laboratorios por recibirme, por su convivencia y sus consejos.

En especial a Juan Cabello y León Sánchez por su apoyo incondicional, sus consejos y observaciones para obtener los mejores resultados.



## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

(Este documento debe acompañar al Trabajo Fin de Grado (TFG)/Trabajo Fin de Máster (TFM) cuando sea depositado para su evaluación).

TRABAJOS DE FIN DE GRADO / FIN DE MÁSTER

D./D<sup>a</sup>. Pierre-Louis GORRY

con nº de DNI 684 999 en aplicación de lo dispuesto en el art.

14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la Universidad de Zaragoza,

Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster)  
Master en Energías Renovables y Eficiencia Energética (Título del Trabajo)

Caracterización del cultivo en semicontinuo  
de la microalga oleaginosa Scenedesmus  
obtusiusculus

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citada debidamente.

Zaragoza, 2 junio 2015

Fdo:

GGorryPL



# INDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>2</b>
2.1 Naturaleza de la luz solar .....	2
2.2 Fotosíntesis .....	3
2.3 Microalgas.....	5
2.4 Productos de interés.....	6
2.5 Sistemas de cultivo.....	8
2.6 Factores críticos para los sistemas de cultivo expuestos a la intemperie.....	9
2.6.1 Intensidad de luz y temperatura.....	9
2.6.2 Otros aspectos climáticos .....	13
2.7 Productividad .....	13
2.8 Recuperación de la biomasa microalgal .....	14
2.9 Lípidos para la producción de biodiesel.....	17
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>5. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>27</b>
5.1 Preparación del inóculo de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> en fotobiorreactor y monitoreo del cultivo.....	27
5.1.1 Inóculo y medio de cultivo.....	27
5.1.2 Fotobiorreactor.....	28
5.1.3 Materiales para los experimentos .....	29
5.2 Métodos de análisis .....	31
5.2.1 Determinación de la concentración de la biomasa en el FBR .....	31
5.2.2 Determinación de los parámetros cinéticos asociados a la biomasa: la productividad y la velocidad de crecimiento.....	31
5.2.3 Determinación de la concentración en nitratos del cultivo .....	32
5.2.4 Determinación de la cantidad de lípidos .....	32
5.2.5 Determinación del contenido en proteínas .....	32
5.2.6 Determinación del contenido en carbohidratos (CHO) .....	33
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
6.1 Cultivo en por lote.....	34
6.1.1 Evolución de la concentración de la biomasa del cultivo batch .....	34
6.1.2 Evolución de las tasas de crecimiento del cultivo .....	35
6.1.3 Evolución de la concentración en nitratos en el cultivo .....	36
6.1.4 Evolución del contenido en lípidos.....	36
6.1.5 Evolución del contenido en proteínas .....	37
6.2 Cultivo semi-continuo.....	37
6.3 Experimentos de sedimentación .....	40
6.3.1 Tiempo de sedimentación teórica para una microalga .....	40
6.3.2 Sedimentación en probetas .....	41
6.3.3 Sedimentación en un sedimentador cónico .....	43
6.3.4 Estudio comportamiento sedimentador de placas .....	46
6.3.5 Sedimentador con placas en continuo con cultivo en continuo .....	49

6.3.6 Recomendaciones y propuestas de diseño para la operación del sedimentador.....	53
<b>6.4 Acumulación de lípidos .....</b>	<b>54</b>
6.4.1 Acumulación de lípidos en limitación con pulso de pH .....	54
6.4.2 Acumulación de lípidos en limitación y pH=5,5.....	57
<b>6.5 Balance de energía.....</b>	<b>59</b>
<b>7. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>67</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>72</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

El continuo aumento en la demanda de energía a nivel mundial dirigirá a una crisis energética debido a la disponibilidad limitada de combustibles fósiles. Más aún, el uso de esta fuente de energía es la responsable de la acumulación de gases de efecto invernadero en la atmósfera y se le asocia a varios efectos negativos sobre el ambiente. Por lo tanto, es necesario investigar sobre fuentes alternas de energía que sean renovables y ambientalmente amigables a partir de los cuales se generen combustibles carbono neutros. Las microalgas son organismos fotosintéticos que utilizan el CO<sub>2</sub> de la atmósfera o de alguna fuente fija contaminante para generar algunos combustibles como hidrógeno, bioetanol, biogás y biodiesel. El hidrógeno puede producir a partir de la fotólisis directa, tanto el etanol como el biogás pueden generarse a partir de procesos de fermentación o digestión anaerobia de la biomasa de las microalgas y el biodiesel a partir del aceite que producen algunas especies de microalgas. Los lípidos de las microalgas son similares a los aceites vegetales y se han sugerido como fuentes potenciales de biodiesel. Los triacilglicéridos de las microalgas pueden convertirse a biodiesel y son renovables, biodegradables y menos contaminantes comparados al diesel del petróleo.

Algunas especies de microalgas son capaces de producir entre 15-300 veces más aceite para la producción de biodiesel que los cultivos tracionales si se compara sus productividades por unidad de área (Chisti, 2007). Las microalgas tienen tiempos cortos de cosecha (1-10 días dependiendo de la especie de microalga y del proceso) permitiendo cosecha continua con rendimientos de biomasa altas. De esta manera, se considera que las microalgas son una fuente de energía sostenible que puede reducir la dependencia de los combustibles fósiles. A pesar de que las expectativas sobre los combustibles a partir de microalgas son altas son necesarios estudios sobre los sistemas de producción que permitan incrementar la productividad de estos sistemas y para reducir los costos.

Este trabajo se centra en las etapas del cultivo y cosecha de una alga oleaginosa, *Scenedesmus obtusiusculus* en un sistema operado a la intemperie bajo un régimen que permitirá la cosecha continua de biomasa.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Naturaleza de la luz solar

La luz es una radiación electromagnética viajando a una velocidad  $c$  de  $\sim 3 \times 10^8$ . La luz tiene diferentes longitudes de onda: entre  $10^{-3}$  y  $10^{-8}$  m. En general, la longitud de onda,  $\lambda$ , se expresa en nm. La luz que puede ver el humano se llama luz visible y está en el rango de 380 nm (el violeta) y 750 nm (el rojo). Esa luz es sólo una parte del espectro de las radiaciones electromagnéticas. Se denomina también como PAR por sus siglas en inglés “Photosynthetically Active Radiation”. Se le llama así porque corresponde al espectro utilizado en la fotosíntesis. Pero de toda la luz que llega a la superficie de la Tierra (al entorno de  $1000 \text{ W.m}^{-2}$  o  $100000 \text{ lux}$  o más o menos  $2000 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) solo una cierta fracción, entre el 40 y 50%, corresponde al PAR [1].

Según la teoría cuántica, la luz está constituida de fotones que tienen una energía determinada  $E$  que es el producto de la frecuencia y de la constante de Planck:  $E=h\nu$ , donde  $E$  es la energía de un fotón o quantum de luz,  $h$  la constante de Planck que vale  $6,626 \times 10^{-34} \text{ J.s}$ , y  $\nu$  la frecuencia de la radiación. La frecuencia y la longitud de onda están relacionadas con la velocidad de la luz así  $\nu=c/\lambda$ . Entonces, la energía está inversamente relacionada con su longitud de onda. Cuanto más grande es la longitud de onda, menos energía tiene el fotón. En consecuencia, un fotón rojo tiene menos energía que un fotón azul. La ley de la equivalencia fotoquímica de Einstein nos dice que una molécula reaccionará únicamente después de haber absorbido la energía de un fotón. Por ejemplo, 1 mol de un compuesto debe absorber  $N_A$  (número de Avogadro  $N_A=6,023 \times 10^{23}$ ) fotones para iniciar la reacción. Se llama Einstein la energía que absorbe este mol de un fotón (Einstein= $6,023 \times 10^{23}$  quanta). Se refiere tanto un Einstein quantum de luz ( $E$ ) que a un mol quantum. En la literatura se encuentran otras maneras de expresar la energía de los fotones que son los volts (V) y el electrón volt (eV) mismo que corresponde a la energía adquirida por el electrón cuando está sometido a un potencial de 1 volt, es decir  $1,6 \times 10^{-19} \text{ J}$  [2].

La luz o flujo de luz se mide en “lumens” (lm) que es el flujo luminoso por unidad de área en todos los puntos, los cuales están en una distancia uniforme de una fuente puntual de luz; la intensidad luminosa se expresa en “lux” ( $\text{lm.m}^{-2}$ ) o foto-candela ( $1 \text{ lm.ft}^{-2}$ ). La irradiación,  $Q$ , o densidad de la radiación de luz es la energía que recibe la superficie y se expresa como unidad de energía como Watts por metro cuadrado ( $\text{W.m}^{-2}$ ). La fotosíntesis es un conjunto de reacciones fotoquímicas que dependen de la cantidad de fotones que inciden en la superficie los cuales van a transmitir su energía. Entonces se puede expresar  $Q$  en términos del número de quanta sobre una unidad de área en un tiempo ( $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  o  $\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

## 2.2 Fotosíntesis

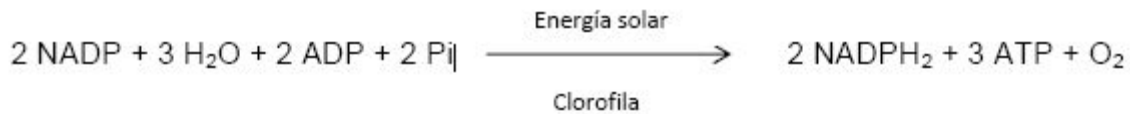
La fotosíntesis es un proceso que convierte la energía que llega en forma de luz y compuestos inorgánicos en compuestos orgánicos por medio de organismos fotoautótrofos como son las algas, plantas y algunas bacterias.

Existen dos tipos de fotosíntesis: la fotosíntesis anoxigénica y oxigénica. La primera se lleva a cabo por bacterias que aprovechan la energía de la luz para extraer los protones y electrones de una gran variedad de moléculas donadoras como el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) obtenido de aguas termales ricas en sulfuro, para reducir el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y así formar moléculas orgánicas. En la segunda, la luz induce una reacción de óxido-reducción (redox, por medio de las clorofilas en los cloroplastos) en la cual el  $\text{CO}_2$  y el agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) se transforman en carbohidratos y oxígeno ( $\text{O}_2$ ). Esta última se encuentra tanto en organismos procariotas (cianobacterias) y eucariotas (algas). Se han identificado dos tipos de reacciones en la fotosíntesis oxigénica: reacciones luminosas y oscuras.

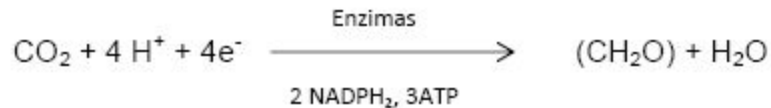
En las microalgas, dentro de la célula, se encuentra un organelo que son los cloroplastos. Están formados de una membrana externa e interna de naturaleza fosfolipídica y separadas por un espacio intermembranal. El interior del cloroplasto está constituido de un fluido acuoso llamado el estroma. En este estroma se encuentra el tilacoide formado de compuestos lipídicos principales mono- y digalactosil glicerol en forma de bi-capa. En esas capas se encuentran las proteínas incrustadas y formando un mosaico líquido [3] y forman vesículas planas o cerradas alrededor del espacio intertilacoidal (lumen). Esa membrana está compuesta de cinco complejos principales: la antena captadora de luz, el fotosistema I (PSI) y el fotosistema II (PSII), el citocromo  $b_6/f$  y la ATP sintasa. Permiten que se mantenga el transporte de electrones y fotofosforilación. En el cloroplasto se encuentran 3 clases de pigmentos orgánicos que permiten la recolección de energía de la luz: las clorofilas, los carotenoides y ficobilinas. Los dos primeros son pigmentos verdes y pigmentos de color amarillo o naranja, respectivamente son lipofílicos y se asocian en complejos de clorofila-proteína, y las ficobilinas son hidrófilicas.

Como ya dicho, la energía de la luz permite la realización de una reacción fotoquímica de óxido-reducción del  $\text{H}_2\text{O}$  de donde se extraen dos electrones formando dos protones  $\text{H}^+$  y  $\text{O}_2$ . Los electrones se transfieren para formar una molécula de  $\text{NADPH}_2$  gracias a una cadena portadora de electrones. Los protones, por su parte, son transportados del estroma al lumen. Este transporte produce un gradiente de pH que favorece la síntesis de ATP que es catalizada por la ATP sintasa. El PSI realiza las reacciones fotoquímicas generando un potencial redox (alrededor de  $-1\text{V}$ ) necesario para reducir la ferredoxina y luego producir el  $\text{NADPH}_2$ . El complejo citocromo  $b_6/f$  se encarga del transporte de los electrones entre los PSII y PSI.

El resultado de esa reacción luminosa es la producción de dos moléculas, el NADPH<sub>2</sub> y el ATP un compuesto de alta energía para la asimilación de carbono inorgánico. las reacciones se pueden resumir de esta manera:

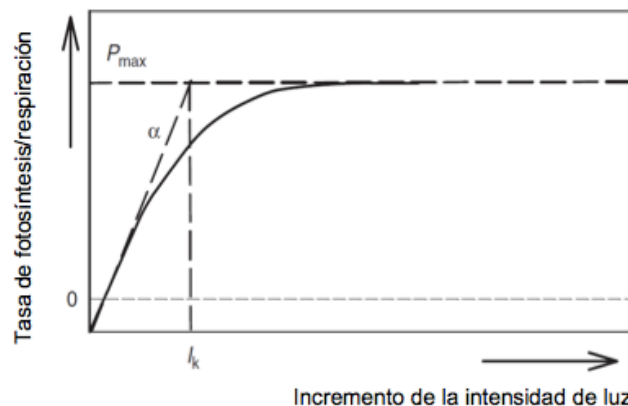


Las reacciones llamadas oscuras ocurren en el estroma y se pueden escribir de la manera siguiente:



De acuerdo a la literatura [1] se requieren al menos 10 fotones para la fijación de una molécula de CO<sub>2</sub>. Como se puede ver en las ecuaciones químicas, se necesita 4 protones y 4 electrones que vienen del agua, es decir: es equivalente a decir que necesita 2 moléculas de NADPH<sub>2</sub> y 3 ATP (productos de la primera ecuación química de justo arriba). La fijación del CO<sub>2</sub> es una reacción química oscura en el sentido que no requiere luz directamente para poder realizarse. Además el CO<sub>2</sub> se incorpora a la célula vía un precursor de 5 átomos de carbono, la ribulosa 1,5 difosfato, para la formación de glucosa y es un proceso endergónico. La regeneración de la ribulosa 1,5 difosfato se hace por el intermedio del proceso llamado Ciclo de Calvin.

Varios estudios llegan a la conclusión que la biomasa de las microalgas contiene aproximadamente 50% en peso seco de carbono [4]. Este carbono viene del CO<sub>2</sub> fijado durante la fotosíntesis. 100 toneladas de biomasa microalga pueden fijar al entorno de 183 toneladas de CO<sub>2</sub> [5]. En ciertas condiciones (de estrés), las microalgas son capaces de aumentar su masa celular hasta el doble en un periodo de 24h y durante su fase exponencial hasta en un periodo de 3.5 h. Obviamente, en esa fase, la tasa de fijación del CO<sub>2</sub> se incrementa.



*Figura 1 – Actividad fotosintética en función de la intensidad de luz*



La actividad fotosintética generalmente se determina a través de mediciones de la evolución del oxígeno disuelto en el medio, a lo que se le llama repuesta a la luz. Se hace una curva, curva de respuesta a la luz (P-I) (figura 1). En la curva se puede identificar 3 zonas distintas: una parte negativa que corresponde a un consumo neto de oxígeno como consecuencia de la respiración por ausencia de luz; una fase exponencial donde la actividad fotosintética aumenta y el oxígeno emitido aumenta (de pendiente  $\mu = P_{\max}/I_k$ ) y una fase estacionaria que corresponde a la tasa máxima de fotosíntesis, es decir que la microalga está saturada en luz. En la fotoinhibición, las tasas fotosintéticas declinan a partir del valor de la intensidad de luz de saturación. Este efecto se debe tanto a la intensidad de la luz como a la duración de la exposición. Por lo tanto, en muchas microalgas tanto de agua dulce o marinas, se pueden fotoinhibir [6] con la luz del sol por tener un rango entre 100-200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Este rango representa apenas una décima parte de la plena luz del sol. Así la saturación de la luz y la fotoinhibición son obstáculos serios para lograr una alta eficiencia fotosintética (PE) la cual influye directamente en la productividad de la biomasa (su crecimiento) y en el diseño de los sistemas de cultivo.

## 2.3 Microalgas

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos tanto unicelulares como multicelulares simples [7], que incluye tanto procariotas (tal como las Cianobacterias), y las eucariotas (Clorofitas y Diatomeas, Bacilarofitas). Las procariotas tienen su ADN libre en el citoplasma junto con las membranas fotosintéticas. Las eucariotas poseen organelos: el citoplasma está dividido en compartimentos por función (aparato de Golgi, mitocondria, cloroplastos, retículo endoplasmático, vacuolas, centriolos) y para proteger su núcleo.

Esos microorganismos presentan ciclos de vida cortos que promueven la formación de esporas de resistencia o células de reposo para sobrevivir en periodos poco favorables. Generalmente viven en cuerpos de agua (dulce o marina). De hecho, desarrollaron características adaptativas por estar a merced del movimiento de su medio y a sus cambios. Esas características se relacionan con la resistencia al hundimiento, la capacidad de absorber rápidamente nutrientes y acumularlos para sobrevivir en épocas o condiciones de escasez. La nutrición se hace por absorción iónica de C, H, O, N, P, S, K, Ca, Fe y Mg y de cantidades traza de Mn, B, Co, Cu, Zn y Mo. Algunas especies requieren además ciertas moléculas inorgánicas y orgánicas complejas como por ejemplo la vitamina B<sub>12</sub> [8].

La pared de los procariotas se constituye de cuatro capas compuestas de mureína (peptidoglicano) y lipopolisacáridos. Esa pared puede estar envuelta por paquetes mucilaginosos, además de tener pequeños poros y apéndices como fimbrillas y pilli. Por añadidura, las cianobacterias tienen una alta digestibilidad para el humano debido a la ausencia de celulosa y a diferencia de la mayoría de las algas que se usan para el consumo humano, por ejemplo: la *Spirulina* [9].

Las procariotas se reproducen por división celular, por fisión binaria o fisión múltiple; por medio de la construcción de una pared. Sin embargo, las cianobacterias no muestran evidencia de reproducción sexual.

Las eucariotas se reproducen tanto de manera vegetativa por división celular de las algas como de manera asexual por medio de fragmentación y producción de esporas. Existen también algunas especies que ocupan la reproducción sexual aunque no sea una característica universal en las algas.

Las microalgas se pueden repartir en categorías según el tipo de metabolismo:

- Fotoautotrófica : usa la luz como única fuente de energía, la convierte en energía química a través de reacciones fotosintéticas;
- Heterotrófica : utiliza como fuente de energía compuestos orgánicos como el carbono;
- Mixotrófica: su principal fuente de energía, la obtiene a través de la fotosíntesis aunque los compuestos orgánicos y dióxido de carbono son esenciales. Los organismos con esta capacidad pueden pasar de un modo autotrófico o heterotrófico dependiendo de la concentración en los compuestos orgánicos y la disponibilidad de la luz;
- Fotoheterotrófico o fotoorganitrófico o fotoasimilación o fotometabolismo: la luz es necesaria al organismo para usar los compuestos orgánicos como fuente de carbono; este sistema es parecido a la mixotrofia y de hecho no está bien definido.

## 2.4 Productos de interés

Las microalgas puede generar muchos productos de interés y con varias posibilidades de aplicaciones comerciales. La acuicultura, los cosméticos, la alimentación humana o las energías son algunas de las aplicaciones de las microalgas y se cultivan a nivel industrial para obtener moléculas de alto valor agregado tales como: fármacos, ácidos grasos polinsaturados para alimentos infantiles, complementos nutricionales, pigmentos en tintes naturales, entre otros. También puede usarse como materia primaria para diferentes tipos de combustibles renovables (con huella de carbono neutro) como biodiesel, biometano, biohidrógeno, biopetróleo y bioetanol [10], [11], [12], [13] (Tabla 1 y esquema 1 adaptado de [14]).

Especie	División	Producción anual	País productor	Aplicaciones
<b><i>Spirulina</i></b>	Cyanophyta	3000 ton	China, India, USA, Myanmar, Japón	Nutrición humana y animal Cosméticos Ficobiliproteínas
<b><i>Chlorella</i></b>	Chlorophyta	2000 ton	Taiwán, Alemania, Japón	Nutrición humana Acuicultura Cosméticos
<b><i>Dunaliella salina</i></b>	Chlorophyta	1200 ton	Australia, Israel, USA, China	Nutrición humana Cosméticos $\beta$ -caroteno

<b><i>Aphanizomenon flos-aquae</i></b>	Cyanophyta	500 ton	USA	Nutrición humana
<b><i>Haematococcus pluvialis</i></b>	Chlorophyta	300 ton	USA, India, Israel	Acuicultura Astaxantina
<b><i>Cryptocodinium cohnii</i></b>	Pyrrophyta	240 ton DHA	USA	DHA
<b><i>Schizochytrium spp.</i></b>	Labyrinthista	10 ton DHA	USA	DHA

*Tabla 1 – Productos, usos y producción anual para diferentes especies de microalgas*

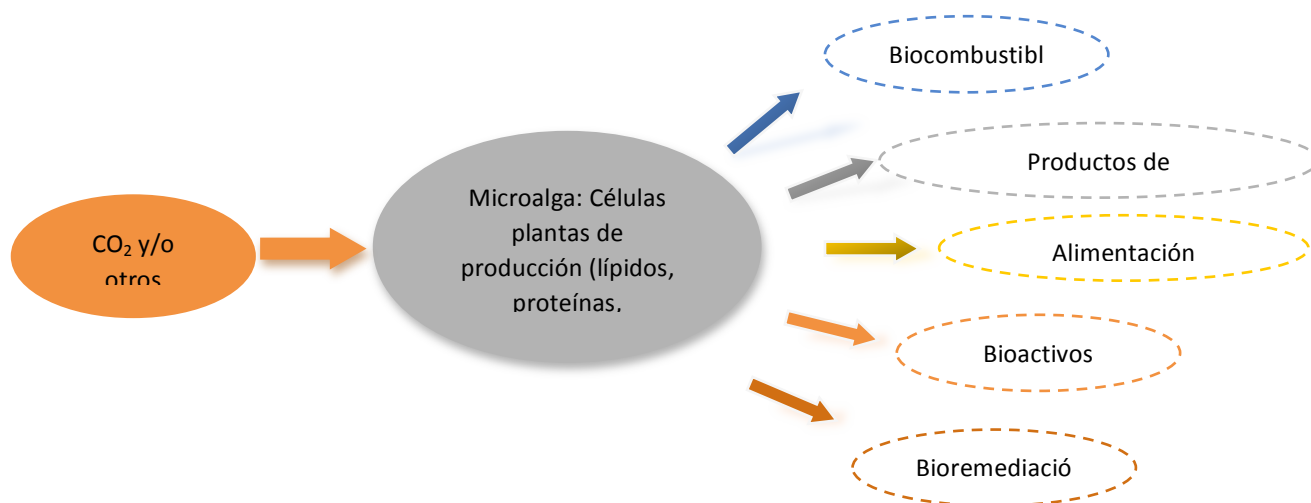
La mayor aplicación, a nivel industrial, es para la nutrición animal, humana, materias primas para la industria farmacéutica. En peculiar en el sector de la salud y nutrición, la *Chlorella* es producida por más de 70 compañías. Por ejemplo en Taiwán se manufacturan y co-producen 400 toneladas de biomasa seca anualmente vendida como nutraceutico o suplemento de la dieta diaria [15]. Las aplicaciones de la biomasa microalgal tienen hasta un potencial terapéutico, en Japón algunos reportes describen ese potencial de la *Chlorella*, y lo recomiendan en el tratamiento en úlceras gástricas, heridas y estreñimiento o como medida preventiva para la arterioesclerosis, la hipertensión y el colesterol. El principio activo más importante es el 1,3 glucano. La *Spirulina* es la otra microalga utilizada en la alimentación. Esa última tiene un contenido alto proteico y excelente valor nutritivo debido a que es una fuente de ácidos grasos que no pueden ser sintetizados por los seres humanos [16], [17].

Como ya fue mencionado antes, las microalgas contienen pigmentos; las principales aplicaciones son como colorante para alimentos o también como suplemento en la alimentación tanto humana como animal, por ejemplo: el  $\beta$ -caroteno que es transformado en vitaminas.

Ciertas algas de color rojo contienen ficocianina o ficoeritrina, pigmentos formando compuestos proteicos como las ficobiliproteínas (de color rojo o azul) que tienen aplicación como colorantes en varios sectores tal como los alimentos, los cosméticos y los productos farmacéuticos.

Además de eso, pueden producir los ácidos grasos tipo omega, que ni los seres humanos ni los animales pueden sintetizar. Por ejemplo, el omega 3 es producido por una microalga dinoflagelada, *Cryptocodinium cohnii*. Hoy en día, el omega 3 es el único ácido graso producido comercialmente mediante las microalgas como suplemento en la dieta diaria de los niños.

El esquema que se muestra a continuación es un resumen de las aplicaciones posibles de las microalgas:



*Esquema 1 – Aplicaciones de las microalgas*

## 2.5 Sistemas de cultivo

Los sistemas de cultivo se reparten en dos categorías: los sistemas abiertos y los sistemas cerrados. Esos últimos se conocen como fotobiorreactores [18], [19]. Ambas categorías llevan varias formas de sistema de cultivo. Así los sistemas abiertos incluyen estanques poco profundos, canales abiertos, estanques circulares y tipo carrusel. En cuanto a los fotobiorreactores (FBR) incluyen las columnas de burbujeo, airlift, de lazo extendido tipo airlift, de placas y otros; ya que muchos aún no cuentan con sistemas de gran escala sino de laboratorio. No obstante todos tienen en común que el mezclado se realiza por suministro de gas (aire, aire + CO<sub>2</sub> puro).

Todos los sistemas tienen en común el objetivo biotecnológico del crecimiento óptimo, y la clave del éxito son factores tal como la luz, la temperatura, los nutrientes y el grado de mezclado [20].

En la tabla 2 se presenta una comparación (tabla 2 adaptado de [21]) entre los dos sistemas de cultivo basados en varios criterios clave para la cosecha y la producción de biomasa:

Tipo de sistema	Sistema cerrado	Sistema abierto
Control de la contaminación	Fácil	Difícil
Riesgo de contaminación	Débil	Alto
Esterilidad	Realizable	Imposible
Control del proceso	Fácil	Difícil
Control de la especie	Fácil	Difícil
Mezclado	Uniforme	Muy bajo
Régimen de operación	Batch o semi-continuo	Batch o semi-continuo
Espacio necesario	Depende del objetivo de la productividad	FBR < Ponds
Área/volumen	Alta (20–200 m <sup>3</sup> )	Bajo (5–10 m <sup>3</sup> )
Densidad población (células)	Alta	Baja
Inversión	Alta	Baja
Coste de operación	Alto	Bajo
Capital/coste operación ponds	Ponds 3–10 veces menos	FBR > Ponds
Eficiencia fotosintética	Alta	Baja
Control de la temperatura	Más uniforme	Difícil
Productividad	3–5 veces más productivo	Bajo
Pérdidas de agua	Depende del sistema de enfriamiento	FBR ~ Ponds
Estrés hidrodinámico sobre la microalga	Bajo-alto	Muy Bajo
Evaporación del medio de cultivo	Bajo	Alto
Control sobre la transferencia de la fase gas	Alto	Bajo
Pérdidas del CO <sub>2</sub>	Depende del pH, alcalinidad, etc.	FBR ~ Ponds

O <sub>2</sub> inhibición	Problema más grande en los FBR	FBR > Ponds
Concentración de la biomasa	3–5 veces más en los FBR	FBR > Ponds
Escalable	Difícil	Difícil

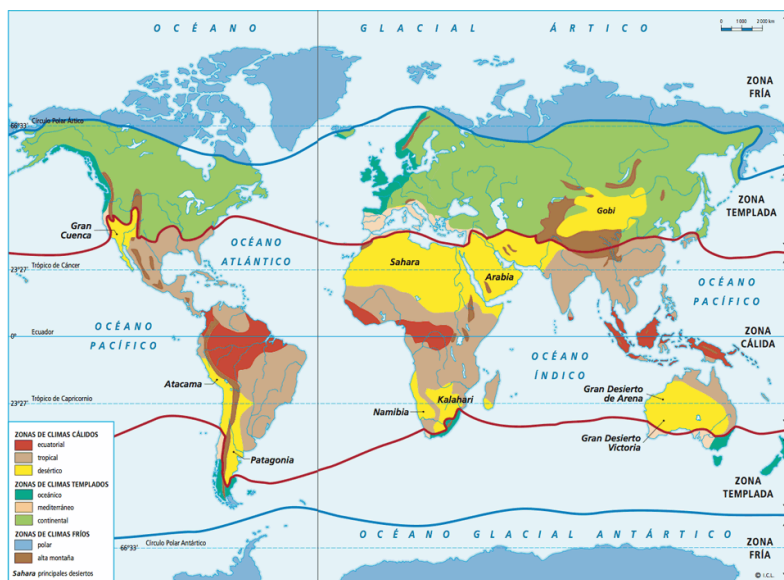
*Tabla 2 – Comparación de sistema abierto y cerrado para el cultivo de microalga*

En resumen los FBR son más caros de construir y operar, pero su alta productividad permite compensar eso. Además de eso, en los fotobioreactores existe un efecto llamado ciclos de luz-oscuridad, mismo que es provocado por las condiciones de mezclado: la mezcla que provoca turbulencias y la concentración van a inducir micro-ciclos de luz-oscuridad haciendo pasar la microalga de la pared al centro del reactor donde casi no hay luz.

## 2.6 Factores críticos para los sistemas de cultivo expuestos a la intemperie

### 2.6.1 Intensidad de luz y temperatura

Factores como la disponibilidad en CO<sub>2</sub>, los nutrientes (como nitrógeno y fósforo), la calidad del agua, las condiciones climáticas afectan la productividad de los sistemas de cultivo. Para su implementación debe considerarse además la disponibilidad de espacio, la época del año (día y horas de luz); factores ambientales en general (viento, precipitaciones, etc.) [22].



*Figura 2 – Zonas climáticas de la Tierra*

El factor más importante y que afecta más el cultivo es la luz, el número de horas de sol depende de la latitud y también afecta la temperatura media del ambiente. Así, para las latitudes más altas, los rayos del sol llegan con un ángulo menor debido a la inclinación de la Tierra, pero eso depende de la temporada del año; en el hemisferio norte, en la parte del clima templado, el invierno está muy marcado y hay pocas horas de luz y al contrario en verano los días son muy amplios. En la zona cálida, las temporadas son menos marcadas y la variación de horas de luz entre invierno y verano cambia poco. En consecuencia, la temperatura promedio es generalmente más elevada en esa zona y las fluctuaciones estacionales en

temperatura e intensidad de luz son menores. Entonces, la zona determina la viabilidad de cultivo a la intemperie. También el nivel de mezclado tiene un impacto importante sobre el cultivo porque controla los ciclos de luz-oscuridad dentro del sistema que varían en fracciones de segundo en comparación a las escalas anteriores de horas o meses para la temperatura y la intensidad de luz [1].

Además, las microalgas necesitan aclimatarse de tal manera que se logre un equilibrio entre las reacciones fotosintéticas de luz y oscuridad [22]; y de esta forma lograr la absorción eficiente de la energía de la luz que le permita la realización de las reacciones fotoquímicas tanto para la producción de NADPH<sub>2</sub> y ATP como para su crecimiento y sobrevivencia.

Así, la intensidad luminosa y la temperatura son los dos factores más importantes para el crecimiento y las reacciones bioquímicas que dependen de la localización geográfica del cultivo. Existe el riesgo de una productividad muy baja por falta de luz, así como la aparición del problema de la fotoinhibición que puede causar su muerte. Se considera como adaptado una radiación de 1500 kWh.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. De acuerdo al mapa que se presenta en las figuras 3, 4, 5, la mayor parte de la superficie terrestre parece ser potencialmente adecuada con relación a la irradiación.

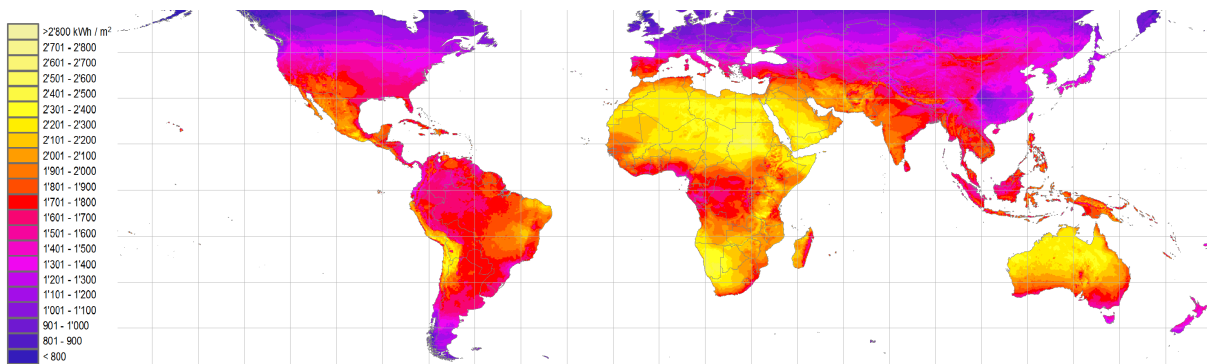
Por otro lado, el espectro de emisión también afecta diversos procesos metabólicos en las algas. En efecto, los intermediarios del ciclo Calvin se ven afectados. Esos intermediarios participan en la síntesis de metabolitos. Así, la luz azul favorece la producción de proteínas y la luz roja los carbohidratos [23], [24]. También, la cantidad de luz afecta el metabolismo de la microalga: una baja intensidad favorece el aumento de sistemas fotosintéticos de la microalga para aprovechar un máximo de luz y por lo tanto el incremento de los pigmentos. Al contrario, una alta iluminación induce una disminución en los pigmentos. Como ya se ha dicho anteriormente durante la fotosíntesis, se produce O<sub>2</sub> que puede provocar inhibición si se encuentra en valores mayores a la saturación del aire [25]. El oxígeno disuelto (o Dissolved Oxygen o DO) depende de la temperatura y de la actividad fotosintética y por consiguiente depende de la hora del día. La combinación de un nivel alto de DO y una alta intensidad de luz pueden provocar fotooxidación que puede dañar a las células de las algas. Sin embargo, esa situación se puede evitar; si el sistema llega a ser mayor del 400% de la saturación del aire [5].

Además una alta intensidad de luz puede provocar fotoinhibición y en consecuencia una disminución en la fotosíntesis y en la tasa de crecimiento en la biomasa. También, existen otros factores como la temperatura que pueden causar una fotoinhibición, como fue demostrado en estudios hechos con *Spirulina* [27] o *Monodus subterraneus* [28].

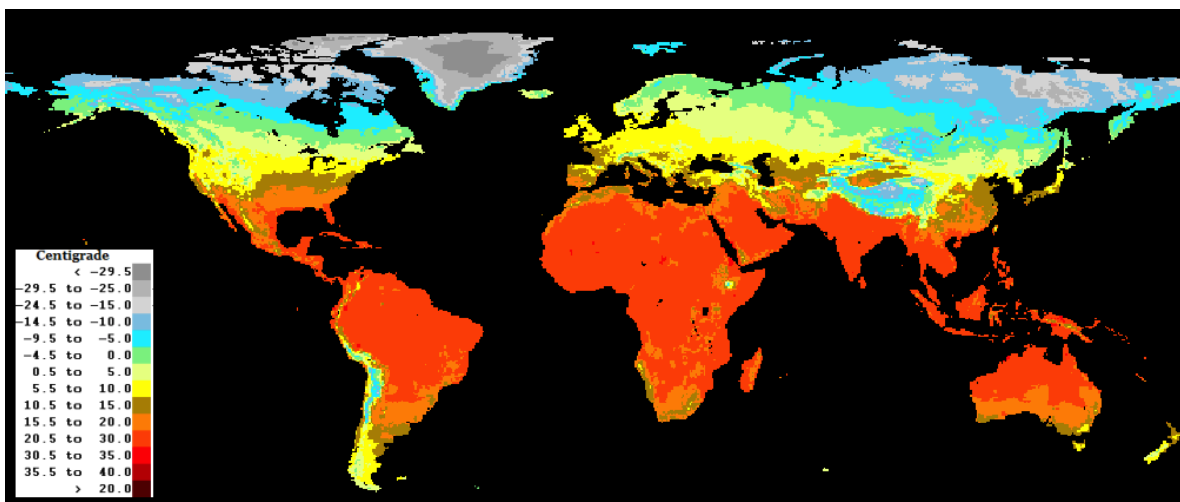
La intensidad de luz afecta también la cantidad y perfil de lípidos: una alta intensidad puede favorecer la producción de lípidos neutros de almacenamiento, principalmente los triacilglicéridos y con una baja intensidad se favorecen los lípidos polares.



La temperatura afecta las velocidades de las reacciones y en consecuencia el equilibrio de esas mismas reacciones y la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa [5], [24]. Como la microalga crece en agua, la fluctuación de la temperatura del aire afecta de manera diferente debido a otros factores tales como el calentamiento del agua por el sol, enfriamiento por evaporación, tipo de sistema (abierto o cerrado) puesto que los cerrados acumulan el calor. En consecuencia la temperatura del ambiente tiene un efecto directo sobre la tasa de crecimiento durante el día y el rango de temperatura ambiente definido por la estación, nos da la estación más adecuada para un sistema de producción de algas [29]. En general se considera que la producción es factible cuando las temperaturas medias mensuales del mes más frío superan los 15°C [29].



*Figura 3 – Mapa de la intensidad de la luz promedio durante el periodo 1991-2010 (fuente: Meeonorm)*



*Figura 4 – Mapa del rango de temperaturas promedio durante el periodo 1991-2010 (fuente: Meeonorm)*

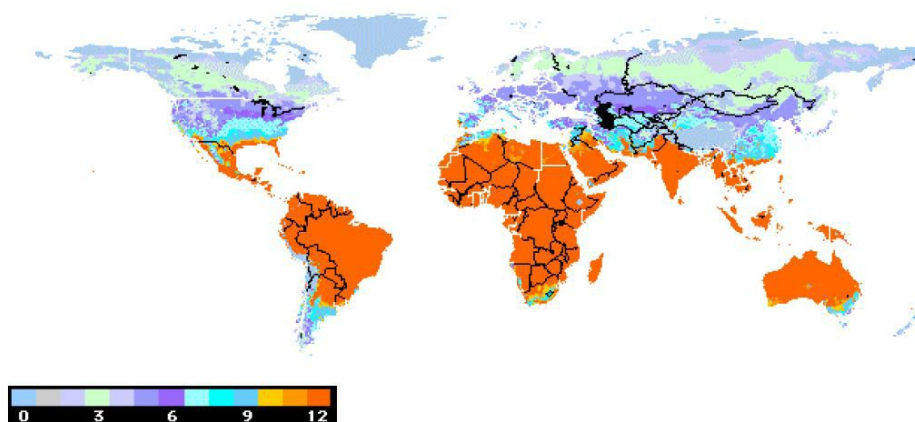


Figura 5 – Mapa la temperatura promedio durante el periodo 1991-2010 (fuente: Meeonorm)

Resulta interesante saber que aunque la mayor parte de la Tierra tiene la irradiación adecuada para cultivar microalgas, no toda la Tierra es adecuada para los cultivos debido a otros factores tales como las temperaturas y las estaciones.

Usando un modelo matemático se puede estimar de manera satisfactoria las temperaturas mínimas, máximas y óptimas de crecimiento.

Espece	Referencia	Tmin (°C)	Topt (°C)	Tmax (°C)	$\mu_{opt}$ (dia-1)
<b><i>Asterionella formosa</i></b>	Butterwick et al. (2005)	12 7.3	12.9 20.1	21.3 29.8	0 1.6
<b><i>Ceraium furca</i></b>	Baek et al. (2008)	1.3 8.4	21.8 24.4	18.4 32.1	0.5 0.6
<b><i>Scenedesmus sp.</i></b>	Xin et al. (2010)	3.1 3.1	26.3 26.3	32.7 32.7	0.8 0.8
<b><i>P. Tricornutum</i></b>	Kudo et al. (2000)	4.7 7.7	19.1 22.5	24.0 25.3	1.3 1.8

Tabla 3 – Rango óptimo de crecimientos de varias especies (fuente:), en negrita los valores del modelo matemático

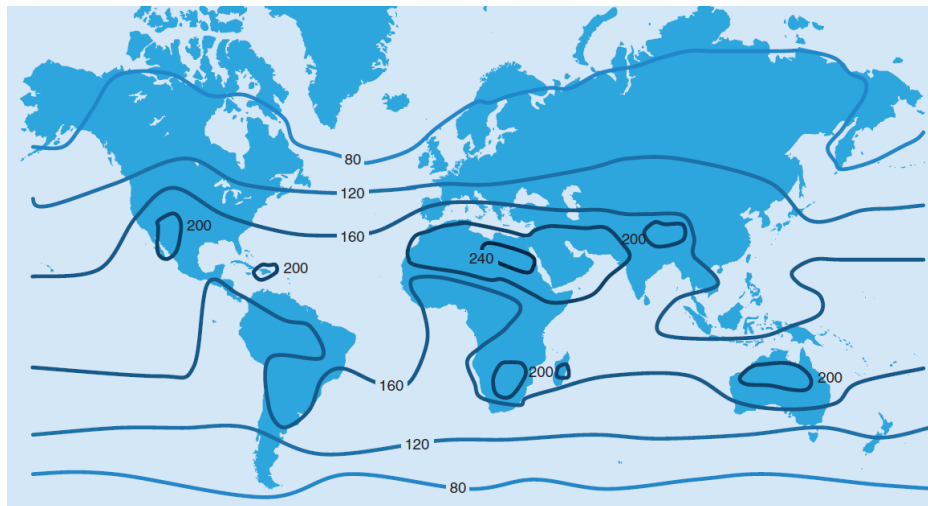
En conclusión, igual que para la producción de energía por medio de paneles fotovoltaicos, térmicos o de eólicas, para el cultivo a la intemperie, es necesario investigar para encontrar el lugar más adecuado para la instalación de los sistemas de cultivo de microalgas que dependerán adicionalmente de las características y tipo la cepa.

### 2.6.2 Otros aspectos climáticos

A escala industrial, los cultivos pueden estar afectados por otros parámetros climáticos tales como las precipitaciones, la evaporación y el clima severo sobre todo en los sistemas abiertos. La lluvia es un factor importante para los sistemas abiertos porque según la temporada y la región del mundo las precipitaciones si son muy altas pueden reducir la salinidad, el pH, provocar choque osmótico y la muerte del cultivo. Por otro lado, una alta temperatura favorece la evaporación y por lo tanto aumenta los requerimientos en agua y en consecuencia incrementan los costos de operación. Los sistemas de cultivo abiertos se ven más afectados mientras que los fotobiorreactores son menos sensibles a esos factores.

## 2.7 Productividad

De esos parámetros se puede sacar una carta de productividad.



*Figura 6 – Isocurvas de la productividad teórica de la biomasa*

Las microalgas tienen una eficiencia fotosintética de 5%. La energía aprovechada por la microalga es almacenada en forma química por medio de los carbohidratos o biomasa. Así durante en un día claro de verano, la irradiancia del sol llega a ser alrededor de  $24 \text{ MJ.m}^{-2}$ , de la cual la biomasa acumula  $1.2 \text{ MJ.m}^{-2}$  con un contenido energético de  $20\text{-}23 \text{ kJ.g}^{-1}$  de biomasa seca y una productividad del cultivo de  $50\text{-}60 \text{ g m}^{-2}\text{día}^{-1}$ . Según la localización geográfica, los parámetros climáticos varían y ya que una gran parte de la Tierra recibe un promedio anual de más de  $22 \text{ MJ.m}^{-2}\text{.día}^{-1}$  (equivalente a  $\sim 80\,000 \text{ GJ}$  por hectárea por año) por lo tanto tienen un potencial de productividad anual de 200 toneladas por hectárea (figura 6) [30]. Como se observa en el mapa, México se encuentra en esa zona privilegiada. Al contrario de Europa que tiene un rango de productividad entre 80-160 toneladas por hectárea (Francia 120 toneladas por hectárea y España 160). También, todos esos factores climáticos hacen del crecimiento de las microalgas en FBR un proceso complejo donde se conjugan la dinámica de fluidos, la actividad fotosintética, y la distribución de la luz en el

reactor [31]. Entonces, se debe evaluar la productividad y elegir la cepa adecuada según la localización para poder escalar la producción al nivel industrial para que sea viable económicamente.

El estudio de la productividad de la microalga se puede hacer de varias formas y se debe hacer simulando las condiciones externas para conocer la viabilidad del cultivo. Las dos principales formas para la determinación de la productividad son la medición de la velocidad de crecimiento [32], [33] y la medición de la tasa de la actividad fotosintética [34], [35]. La tasa de crecimiento está influenciada por la fotosíntesis, la dinámica de fluidos en el reactor (mezclado, hidrodinámica, transferencia de masa, etc), la distribución de la luz dentro del reactor. Pero no se puede separar la influencia de los factores anteriormente mencionados. Además de eso, los sistemas controlados (con luz artificial) tienen un régimen muy diferente de la luz y por lo tanto inducen a un error en la precisión de las simulaciones. Sin embargo, el conocimiento de la tasa de fotosíntesis permite tomar en cuenta el conjunto de esos factores porque es proporcional a la productividad de la biomasa ya que la actividad fotosintética depende de todo el metabolismo de la microalga (acumulación de energía en forma química para poder crecer, estequiometría de las reacciones fotosintéticas). Además, la actividad fotosintética se puede medir vía la evolución de la producción de oxígeno, por fluorescencia del PSII o por asimilación del carbono 14 radioactivo [36], [37]. Se considera la medición del oxígeno como la más precisa no obstante existen diversos métodos descritos en la literatura y presentan discrepancias importantes [38], [32], [34], [35]. La actividad fotosintética está estrechamente enlazada a la cepa y al sistema usado, pues es necesario considerar ciertos aspectos durante la medición del oxígeno como la atenuación de la luz dentro del reactor, la duración de los experimentos, el agotamiento de los nutrientes, las fluctuaciones diarias de la producción y la precisión de las mediciones.

Otro aspecto que influye en la actividad fotosintética es el régimen de luz dentro del cultivo. En efecto, en un cultivo por lote el régimen de luz va evolucionar a medida que crece la biomasa: se considera que a partir de una cierta concentración de biomasa para un sistema no llega ninguna luz a partir de un cierto punto del sistema. En resumen, existe un gradiente de luz a dentro del cultivo el cual afecta directamente la tasa de crecimiento pero eso depende también del mezclado o sea de la disponibilidad de luz para las células de las microalgas y de otros factores ya mencionados en la parte de la medición del oxígeno como parámetro de estudio de la actividad fotosintética.

## 2.8 Recuperación de la biomasa microalgal

Una vez que se ha realizado el cultivo de las microalgas, hay que recuperar la biomasa generada. Existen varios métodos para recuperar la biomasa: sedimentación, centrifugación, secado, filtración etc. Pero esa etapa de la producción de biomasa tiene un coste importante, se ha estimado que corresponde entre un 20-30% del coste total de producción [62] ya que apenas entre los 2-7% totales sólidos suspendidos (TSS) corresponde a la biomasa. En efecto, la recuperación de la biomasa involucra una o varias etapas de

separación sólido-líquido. Sin embargo se sabe que no existe un método universal de recuperación ya que depende del tipo de cultivo, del sistema de cultivo, de la cepa y otros factores [21]. Sin embargo, es una área de la investigación muy activa para desarrollar un proceso de recuperación eficiente que permita la minimización del costo para cualquier especie de microalga.

El primer paso consiste en concentrar la microalga con el fin de disminuir luego el coste de separación. Para realizar esa operación se puede sedimentar, sin embargo, la sedimentación es difícil debido al tamaño de las microalgas [40] y se pueden usar floculantes para agregar las microalgas y formar partículas más grandes y facilitar la sedimentación, filtración o centrifugación. También se puede favorecer la sedimentación vía un cambio de pH, adición de floculante, ultrasonido [40] y nuevos métodos como la introducción de nano partículas magnéticas para favorecer la sedimentación [41]. Hoy en día, lo más eficiente para favorecer la sedimentación es el uso de floculante, pero tienen un inconveniente importante: la contaminación de la biomasa en el caso de floculantes metálicos, además de la necesidad de una etapa para recuperar el floculante y limpiar la biomasa, lo que conlleva un costo adicional al costo del floculante. Además, no se pueden usar esos floculantes metálicos si la biomasa tiene una aplicación nutricional o cosmética ya que algunos de esos metales (aluminio entre otros) son conocidos por ser cancerígenos. Existen floculantes biológicos pero aún son muy caros.

En general, la sedimentación o decantación se usan como primer paso combinándose con otros métodos como floculación, ultrasonido ó electrofloculación empleados para concentrar la microalga. De hecho existen varios tipos de sedimentación en lote o en continuo: en estanque (lote o continuo), estanque con placas (solo continuo ya que requiere un flujo), estanques cilíndricos (continuo). Para determinar los parámetros de diseño del sedimentador se usa generalmente la ley de Stokes para sedimentación, la cual toma en cuenta las fuerzas físicas que experimenta la partícula: el peso, principio de Arquímedes, fuerza de frotamiento [42]. Una de las configuraciones más eficientes son los sedimentadores de placas porque para una eficiencia de separación igual ocupa menos espacio que un sedimentador simple tipo estanque. La principal dificultad consiste en la recuperación de los « lodos » ya que la biomasa tiende a formar una biopelícula que se pega en las paredes.

La ley de Stokes se resume así:

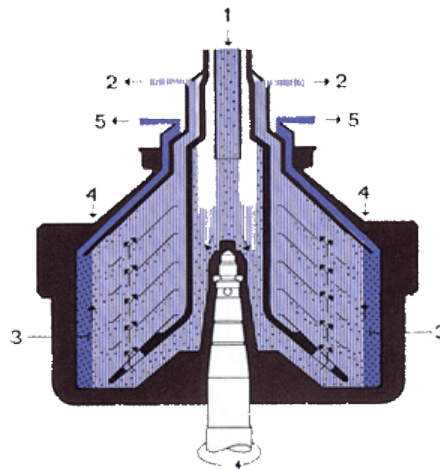
$$v_s = \frac{2 * r^2 * g * (\rho_p - \rho_f)}{9 * \mu}$$

Con  $r$ , el radio de la partícula (radio de una microalga) en m,  $g$  la gravedad en  $m/s^2$ , las masas volumétricas  $\rho_p$  y  $\rho_f$  respectivamente de la partícula y del fluido en  $kg/m^3$  y  $\mu$  la viscosidad dinámica del fluido en Pa/s (o  $kg/m.s$ ).

En la sedimentación se considera que las partículas son inertes aunque el cultivo es un sistema biológico. En consecuencia, la sedimentación puede cambiar dependiendo del tipo de cepa y otros

parámetros (edad de la microalga –la cual afecta su tamaño y su densidad-, las condiciones del cultivo que pueden afectar su carga). En este punto, la literatura es bastante pobre en cuanto a la influencia de esos parámetros que hace complejo la interacción de la microalga con su medio y aún no existe ningún modelo matemático que tome en cuenta otros factores.

Actualmente, el proceso más usado para la recuperación es la centrifugación. Proceso que se realiza a nivel industrial y que permite concentrar la biomasa 150 veces más y obtener un efluente al 15%. Sin embargo, la centrifugación es un proceso con alto consumo de energía, así con una eficiencia de 95% se consume 20 kWh/m<sup>3</sup> para un flujo 2 L/min lo que repercute en un costo de casi 60 \$/L para los lípidos [43]. Por eso la investigación es muy activa en esa área de separación para encontrar un método más económico. La centrifugación (ver esquema 2) usa la fuerza centrífuga para sedimentar los sólidos y concentrarlos vía una turbina de forma cónica o cilíndrica que gira a gran velocidad. El agua residual sale por los puntos 2 y el cultivo concentrado por los puntos 5. El punto 1 corresponde a la entrada del cultivo. El punto 3 es la zona de sedimentación y de recolección del cultivo concentrado. El punto 4 designa la parte móvil de la centrifuga cual induce la sedimentación.



*Esquema 2 - Centrifuga industrial*

Pero como ya se ha mencionado, la centrifugación requiere mucha energía y es más eficiente con un flujo bajo de cultivo, así que trata un flujo de cultivo relativamente bajo. Pero considerando que los volúmenes de cultivos son grandes, una opción consistiría en aumentar el flujo de procesamiento; lo que disminuirá la eficiencia, la energía consumida y hasta cierto punto el costo de producción de lípidos; para un flujo de 18 L/min, la centrifuga tiene una eficiencia de 28.5% y disminuye el precio de los lípidos a 0.864 \$/L lípidos [43].

La filtración es otra de las alternativas para microalgas de tamaño superior a 70 μm. Para tamaños de células inferiores a 30 μm no se puede usar la filtración clásica sino la microfiltración y ultra-filtración (que



usa la presión hidrostática). No obstante, la filtración requiere un mantenimiento mayor, tiene que ser limpiado y es necesario cambiar el filtro, además de que sólo puede tratar flujos bajos.

Nuevos métodos de concentración como el uso de ultrasonido, variación de pH permiten una mejor sedimentación sin ensuciar la biomasa y sin desnaturalizar los metabolitos. Otro nuevo proceso que tiene mucho éxito recientemente en la investigación es la electro-coagulación-floculación (ECF). Este método combina la coagulación-floculación de un floculante a una corriente eléctrica que favorece la formación de floculantes y en consecuencia la sedimentación de la microalga. Con ese método, se liberan iones de aluminio o de hierro mediante un ánodo de sacrificio. Asociado a un pH bajo, la electrofloculación reduce de manera considerable el tiempo de sedimentación (orden de la media hora) con una eficiencia alrededor del 80-95% [44]. El inconveniente es la contaminación con aluminio de la biomasa, no obstante es inferior a 1% y según la aplicación de la microalga no es necesariamente un problema y la necesidad de regenerar el ánodo. Aún queda escalar el proceso al nivel industrial para evaluar la consumación energética del proceso con volumen más importante de agua.

Una vez concentrado, es necesaria la recuperación de la biomasa. Para eso existen dos opciones: congelar la biomasa o secarla. El secado puede hacerse de 2 formas: el secado natural con el sol y el secado forzado con un secador industrial. El secado solar requiere grandes superficies y es un proceso largo pero barato. El secador industrial es más rápido pero conlleva un costo importante por la cantidad de energía requerida, además de que puede dañar la biomasa y desnaturalizarla. La opción de congelar la biomasa tiene la ventaja de no deteriorar los pigmentos y otros compuestos orgánicos de valor agregado, además de facilitar la extracción de ciertos compuestos como los lípidos. El costo de la congelación de la biomasa es equivalente al del secado, sin embargo, cabe mencionar que en operaciones a grande escala resulta más caro [40].

## 2.9 Lípidos para la producción de biodiesel

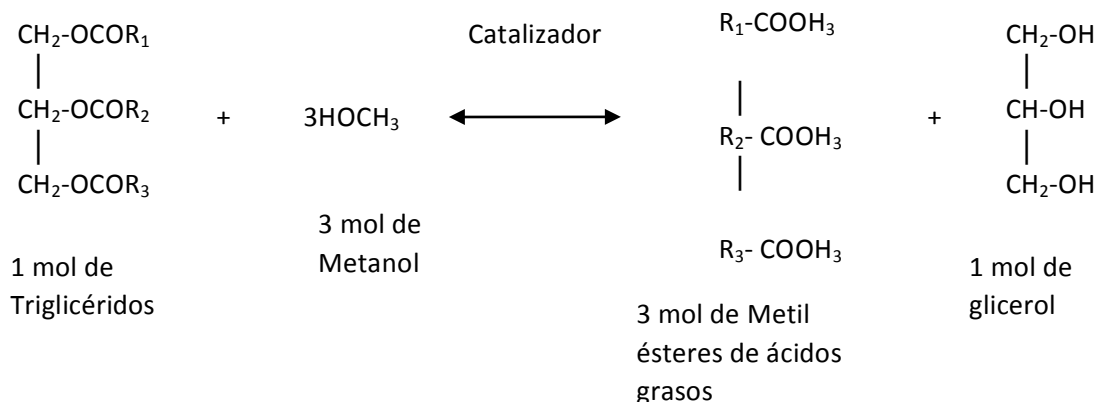
La producción de lípidos para biodiesel, es una de las aplicaciones que actualmente es a un tópico importante de investigación. En efecto, en el contexto actual de escasez de los recursos fósiles y del cambio climático, se buscan fuentes renovables o con una huella de carbono neutro. Las microalgas tienen ese potencial de producir biodiesel con una huella de carbono neutro. Los intentos de producción de biodiesel a partir de aceite que provienen de cultivos alimentarios (primera generación), a partir de cultivos de plantas no destinadas para alimentos (segunda generación) no son concluyentes. En efecto, los cultivos generan conflictos y tensiones socio-económicas (ocupación de superficie agrícola, competencia con los productos alimentarios) y además su rendimiento es bajo. Entonces las microalgas son una alternativa conveniente y atractiva porque eliminan ese conflicto relacionado con la utilización de superficies agrícolas puesto que se pueden cultivar en superficies no fértiles y presentan un rendimiento mayor a la superficie (tabla 4).

<b>Especie</b>	<b>Contenido en lípidos de la semilla (% de lípidos para biomasa seca)</b>	<b>Rendimiento (L lípidos/ha.año)</b>	<b>Superficie requerida</b>	<b>Productividad del biodiesel (kg/ha.año)</b>
<b>Maíz (Zea mays L.)</b>	44	172	66	152
<b>Cáñamo (Cannabis sativa L.)</b>	33	363	31	321
<b>Soja (Glycine max L.)</b>	18	636	18	562
<b>Jatropha (Jatropha curcas L.)</b>	28	741	15	656
<b>Camelina (Camelina sativa L.)</b>	42	815	12	809
<b>Colza (Brassica napus L.)</b>	41	974	12	862
<b>Girasol (Helianthus annuus L.)</b>	40	1070	11	946
<b>Ricina (Ricinus communis)</b>	48	1307	9	1156
<b>Aceite de palma (Elaeis guineensis)</b>	36	5366	2	4747
<b>Microalga (baja acumulación de lípidos)</b>	30	58700	0,2	51927
<b>Microalga (acumulación media de lípidos)</b>	50	97800	0,1	86515
<b>Microalga (alta acumulación de lípidos)</b>	7°	136900	0,1	121104

*Tabla 4 – Productividad del biodiesel por varias cepas (fuente y adaptado: [21])*

El biodiesel se compone de monoalquilésteres obtenidos mediante reacciones de alcoholes de cadena corta (metanol o etanol en general) con ácidos grasos de cadena larga obtenidos de biomasa renovable. Una vez que la biomasa ha sido recuperada del cultivo, hay que pasarla por un proceso de transesterificación (o alcoholisis) de los lípidos. La microalga acumula los lípidos de diferentes categorías y no todos son apropiados para hacer biodiesel [45]. La composición principal son triacilglicéridos, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, fosfolípidos, glucolípidos y pigmentos (carotenoides, clorofilas,

ficobilinas). Hace poco, se demostró que el biodiesel producido a partir de aceites de microalgas puede sustituir al diesel de origen fósil como combustible [47].



Para obtener una alta producción de biodiesel y que sea viable a nivel industrial es necesario seleccionar la cepa adecuada (alto contenido en lípidos), resistente a las condiciones ambiente, mayor concentración en el cultivo, es decir: con un rendimiento elevado de biomasa conjunto a una alta concentración en lípidos (tabla 5). Al mismo tiempo es necesario desarrollar estrategias de cultivo que favorezcan la acumulación de lípidos como las condiciones de cultivo en limitación de nitrógeno (sin nitrato) o cambiando el pH [48].

El primer paso para la obtención de biodiesel consiste en la extracción de los lípidos. A partir de la biomasa seca o congelada, se tritura la microalga para hacer polvo y luego se extrae los lípidos por el método de soxhlet (extracción sólido-líquido). El proceso consiste en lavar la biomasa de manera sucesiva con hexano. Se evapora hexano desde un matraz y con una columna de reflujo y un extractor de Soxhlet, se recupera el hexano y se mezcla con la biomasa en un dedal. El hexano poco a poco extrae los lípidos y cae con los lípidos en el matraz. Después de un número de ciclos de evaporación-lavados se recuperan los lípidos del hexano. Para eso se realiza la evaporación del hexano.

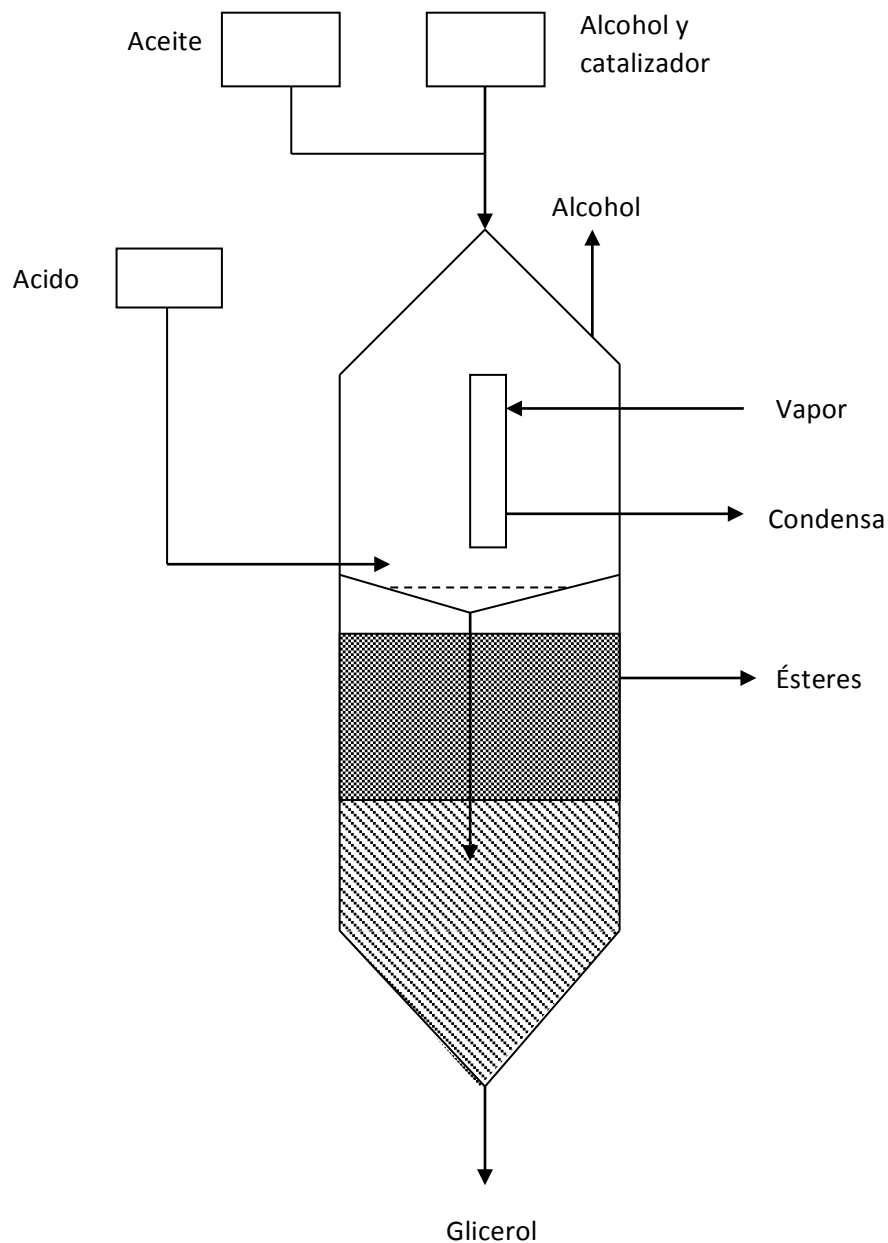
Una vez que se han extraído los lípidos, se realiza la transesterificación para transformarlos en biodiesel. Una molécula de triglicéridos (ácidos grasos) se esterifica y se generan tres moléculas de metil ésteres y una de glicerol según la reacción de transesterificación o alcoholisis  $R_i$ : son los grupos hidrocarburos.

Especie	Productividad (g/(L.d))	Contenido en lípidos (% biomasa seca)	Productividad de lípidos (mg/(L.d))
<i>Botryococcus braunii</i> UTEX 572	0,03	20,8	5,5
<i>Chaetoceros calcitrans</i> CS 178	0,04	39,8	17,6
<i>Chaetoceros muelleri</i> F&M-M43	0,07	33,6	21,8
<i>Chlorella protothecoides</i> CCAP 211/8D	0,002–0,02	11,0–23,0	0,2–5,4
<i>Chlorella protothecoides</i>	2,2–7,4	50,3–57,8	1209,6–3701,1
<i>Chlorella</i> sp. F&M-M48	0,23	18,7	42,1
<i>Chlorella</i> sp.	0,37–0,53	32,0–34,0	121,3–178,8
<i>Chlorella vulgaris</i> KCTC AG10032	0,1	6,6	6,9
<i>Chlorella vulgaris</i> INETI 58	0,18	5,1	7,4
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck CCAP 211/11B	0,03–0,04	18,0–40,0	5,4–14,9
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck CCAP 211/11B	0,02–0,04	28,0–58,0	11,2–13,9
<i>Chlorella vulgaris</i> F&M-M49	0,2	18,4	36,9
<i>Chlorococcum</i> sp. UMACC 112	0,28	19,3	53,7
<i>Dunaliella tertiolecta</i> PIMAR	0,12	16,7	20
<i>Dunaliella tertiolecta</i> ATCC 30929	0,1	60,6–67,8	60,6–69,8
<i>Nannochloris</i> sp. UTEX LB1999	0,04–0,35	29,9–40,3	15,6–109,3
<i>Nannochloropsis</i> CS 246	0,17	29,2	49,7
<i>Nannochloropsis oculata</i> NCTU-3	0,37–0,48	22,7–29,7	84,0–142,0
<i>Nannochloropsis</i> sp. F&M-M28	0,17	35,7	60,9
<i>Nannochloropsis</i> sp. F&M-M29	0,17	21,6	37,6
<i>Neochloris oleabundans</i> UTEX 1185	0,03–0,15	15,9–56,0	10,7–38,8
<i>Neochloris oleabundans</i> UTEX 1185	0,31–0,63	7,0–40,3	38,0–133,0
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> F&M-M40	0,24	18,7	44,8
<i>Porphyridium cruentum</i>	0,37	9,5	34,8

<b><i>Scenedesmus obliquus</i> FCTU Coimbra</b>	0,09	17,7	15,9
<b><i>Scenedesmus obliquus</i></b>	0,06	12,7	7,14
<b><i>Scenedesmus obliquus</i></b>	0,10–0,51	6,6–11,8	11,6–58,6
<b><i>Scenedesmus quadricauda</i></b>	0,19	18,4	35,1
<b><i>Scenedesmus</i> sp. KCTC AG20831</b>	0,22	9,5	20,7
<b><i>Scenedesmus</i> sp. DM</b>	0,26	21,1	53,9
<b><i>Scenedesmus</i> sp. F&amp;M-M19</b>	0,21	19,6	40,8
<b><i>Skeletonema costatum</i> CS 181</b>	0,08	21,1	17,4
<b><i>Skeletonema</i> sp. CS 252</b>	0,09	31,8	27,3
<b><i>Spirulina maxima</i> LB 2342</b>	0,21	4,1	8,6

*Tabla 5 – Productividad y contenido en lípidos de varias cepas comunes (adaptado de [49])*

En la industria, se usan la proporción de 6 moles de metanol para cada mol de triglicéridos para favorecer el sentido directo de la reacción (producción de metil ésteres el cual es el producto que forma el biodiesel). El rendimiento es alrededor de 98% de producción de biodiesel en peso. La reacción es catalizada mediante ácidos, álcalis (NaOH, KOH) y lipasa (una enzima). Los álcalis funcionan 4000 veces más rápido que los ácidos. La reacción se lleva a cabo a 60°C (el metanol hierve a 65°C), con una presión de 1 atm y con 1% en concentración por peso de aceite de catalizador [50], [21], [5] y se realiza en 90 minutos. Se obtienen 2 fases que se pueden separar de manera directa y continua durante el proceso (ver esquema 3 adaptado de [50]).



*Esquema 3 – Reactor continuo de transesterificación de los lípidos en biodiesel*



Para prevenir reacciones de saponificación, es necesario secar el alcohol y el aceite. Una vez recuperada la fase de los ésteres se tiene que lavar con agua para sacar el glicerol residual y el metano de exceso.

Se han estudiado diversas estrategias para aumentar la productividad lipídica, seleccionando las mejores especies, en términos de contenido de lípidos, adaptando cepas a condiciones ambientales extremas y estableciendo estrategias de cultivo adecuadas que inducen una mayor acumulación de lípidos y de biomasa para obtener la máxima productividad de lípidos y de biomasa. Algunas de ellas son la aplicación de diferentes niveles de salinidad, limitación de nitrógeno durante el crecimiento [59], [16], [60], [7], sin embargo esa estrategia tiene la desventaja de que el aumento en los lípidos limita el aumento de la biomasa, la limitación de fósforo causa cambios en el perfil de ácidos grasos y contenido total de lípidos [61], y la aplicación de ciclos de luz/oscuridad también favorece el metabolismo heterotrófico de ciertas microalgas.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En el grupo de investigación sobre combustibles a partir de microalgas de la UAM-C se cuenta con una microalga oleaginosa que fue aislada de Cuatro Ciénegas Coahuila y que fue identificada como *Scenedesmus obtusiusculus* [39]. Esta microalga es capaz de acumular hasta 50% de aceite cuando se encuentra bajo limitación de nitrógeno. Entre los sistemas de cultivo empleados se tienen columnas de burbujeo y de placas planas donde se han obtenido productividades lipídicas entre 200-340 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> [51] y fotobiorreactores airlift operados a la intemperie [52]. El máximo de biomasa reportado para esta cepa es de 6 g L<sup>-1</sup> en condiciones de laboratorio y hasta 5.2 g L<sup>-1</sup> en un reactor airlift de lazo extendido. La cepa tiene un gran potencial por su alta capacidad de acumulación de aceites y que además puede resistir altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (15%), su óptimo de temperatura está en alrededor de 35°C y puede operar en condiciones a la intemperie. Sin embargo todos los ensayos realizados a la fecha han sido en sistemas de cultivo que operan en lote. La operación en semi-continuo es importante ya que permitirá tener una cosecha continua de microalga y evitar el colapso que sufren los sistemas cuando se tienen altas concentraciones de biomasa debido a la dificultad para la baja penetración de luz. Bajo este régimen de operación será importante además contar con un sistema eficiente de recuperación de biomasa para permitir su posterior procesamiento.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterizar un sistema de producción en semi-continuo de la biomasa microalgal de la cepa *Scenedesmus obtusisculus* y realizar un balance de energía del dicho proceso

### Objetivos específicos

- Determinar las tasas de generación de biomasa de la microalgas en un fotobiorreactor de burbujeo operado a la intemperie
- Implementar un sistema acoplado de cultivo de microalgas para su operación en semi-continuo incluyendo la etapa de fotobiorreactor y recuperación de biomasa.
- Caracterizar la operación del sistema bajo condiciones de crecimiento y limitación de nitrógeno para fomentar la acumulación de lípidos.
- Realizar balance de energía.

### Actividades

Las actividades a realizar serán:

- 1) Familiarización del trabajo experimental en el laboratorio
  - a. Microbiología (cultivo y propagación de los cultivos)
  - b. Métodos analíticos (técnicas de cuantificación de biomasa, proteína, lípidos, nitratos, pH, cromatografía de gases)
  - c. Fotobiorreactor
    - Identificación de las diferentes partes del sistema de cultivo
    - Sistema de adquisición de datos (para la captura de datos, O<sub>2</sub> disuelto, pH, CO<sub>2</sub> disuelto, intensidad luminosa, etc)
    - Identificación de parámetros de operación importantes
    - Monitoreo y muestreo de la biomasa
- 2) Revisión del estado del arte en cuanto a las investigaciones sobre microalgas y del grupo de investigación
- 3) Operación el sistema en los regímenes de operación en lote
  - a. Determinar las tasas de crecimiento de la biomasa
  - b. Determinar las tasas de dilución a emplear
  - c. Operación del sistema bajo limitación de nitrógeno para fomentar la acumulación de lípidos
- 4) Implementación un sistema de operación en semincontinuo
  - a. Acoplar sistemas de alimentación continua de medio de cultivo
  - b. Acoplar sistema sedimentación

c. Integración de las diferentes etapas

- 5) Caracterización la operación del sistema en semicontinuo (fotobiorreactor-sedimentador)
- 6) Realización de un balance de energía/costeo para establecer etapas críticas y puntos de mejora del proceso

## 5. MATERIALES Y METODOS

En el presente estudio, se usó la cepa mexicana *Scenedesmus obtusiusculus*, originaria de Cuatro Ciénegas, aislado por un equipo de la UAM-Cuajimalpa [53]. El objetivo de este experimento fue familiarizarse con el seguimiento de un cultivo y de los métodos de análisis de las muestras.

Una de las características de esa cepa es su amplio rango de tolerancia a varias condiciones de crecimiento (rango de temperatura entre 5 y 40°C, pH entre 4 y 11, irradiancia entre 0 y 500  $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ ).

### 5.1. Preparación del inóculo de *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobioreactor y monitoreo del cultivo

#### 5.1.1. Inóculo y Medio de cultivo

Para obtener la biomasa para la inoculación del fotobioreactor, se preparó el medio de cultivo BG-11 cuya composición se muestra en la tabla 6, [52], [53]. Este medio se utilizó en condiciones normales para experimentos de crecimiento y en condiciones de limitación (sin nitratos) para promover la acumulación de lípidos:

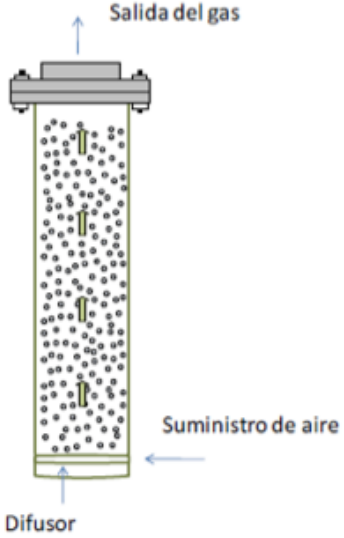
Medio de cultivo BG11 y BG11 sin nitratos (SN)		
Minerales	Para BG11 Cantidad (g/L)	Para BG11-SN Cantidad (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	1.5	0
(o KNO <sub>3</sub> )	1.7	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.04	0.08
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075	0.15
EDTA disódico de magnesio	0.001	0.002
Ácido cítrico	0.006	0.012
Citrato de amonio férrico	0.006	0.012
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02	0.04
Metales traza A5+CO	1 mL/L <sub>reactor</sub>	2 mL/L <sub>reactor</sub>

*Tabla 6 - Minerales para preparar el medio de cultivo BG11 y BG11-SN según el volumen de cultivo requerido*

### 5.1.2. Fotobiorreactor

Los experimentos en lote y en semicontinuo se realizaron con un fotobiorreactor tipo columna de burbujeo (FBR-CB) con las siguientes características y condiciones de operación (Tabla 7) durante otoño y invierno respectivamente :

Datos FBR-CB	
<b>Diámetro, D(cm)</b>	14.3
<b>Altura, h (cm)</b>	172.6
<b>Volumen total, <math>V_{Total}</math> (L)</b>	27,7
<b>Volumen efectivo, <math>V_{FBR-CB}</math> (L)</b>	24
<b>pH<sub>ideal</sub></b>	8
<b>Flujo aire (L/min)</b>	9
<b>Flujo CO<sub>2</sub> (L/min)</b>	0.09
<b>Concentración Inicial en biomasa del FBR (g/L)</b>	0.1



*Tabla 7 – Datos de funcionamiento del FBR-CB*

Este FBR-CB contó con un sistema de adquisición de datos, donde el almacenamiento de los datos de humedad relativa y la temperatura ambiente se realizó con un data logger “EXTECH RH10” . Para el monitoreo de la temperatura del medio líquido se usó un data logger “Measurement computing USB-501-TC-LCD”. Ambos sensores se programaron para adquirir datos cada 5 minutos.

El monitoreo de la irradiación solar se hizo por medio de un data logger “Dataloggin light meter SPER SCIENTIFIC 850008” que cuantifica la irradiación de luz PAR y se programó para adquirir datos cada 5 minutos.

Para los experimentos de acumulación de lípidos, el monitoreo se realizó por medio de una tarjeta de adquisición de datos (CompactDAQmx, NI, USA) conectada a un ordenador cual registraba en linea cada 5 minutos por medio del software NI LabView la temperatura del cultivo (termopar tipo K), el pH (AppliSens, USA) y el oxígeno disuelto con un Clark-type polarographic sensor (YSI Incorporated, USA). La figura 7 presneta el sistema de adquisición.



*Figura 7 – Sistema de monitoreo del cultivo en línea*

### 5.1.3. Materiales para los experimentos

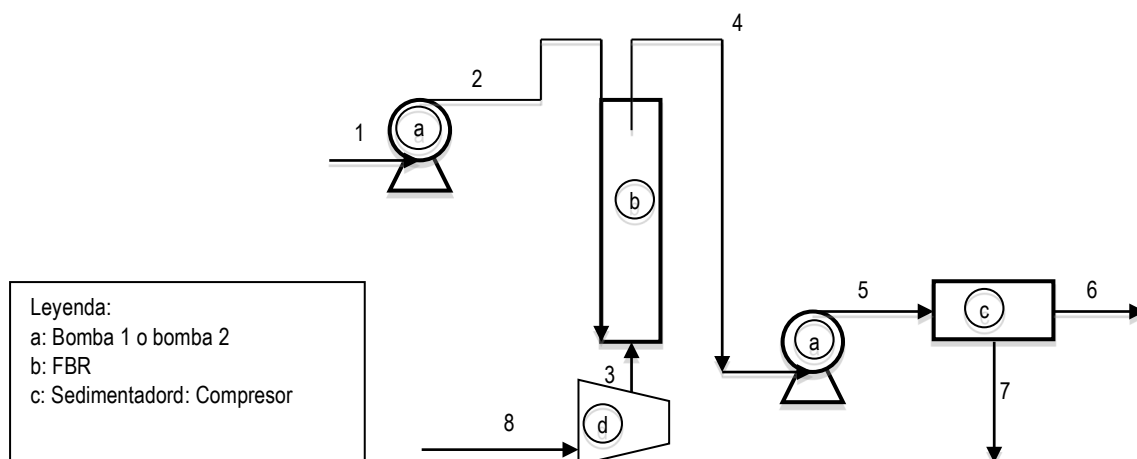
Para realizar el cultivo en continuo se usaron bombas peristálticas de marca Masterflex con un flujo de 3 mL/min hasta 580 mL/min.

En la tabla 8 abajo se presentan las características del sedimentador con placas.

Se usaron 3 recipientes de 20 litros para el medio fresco, para la recuperación de la biomasa y para su almacenamiento antes de centrifugar.

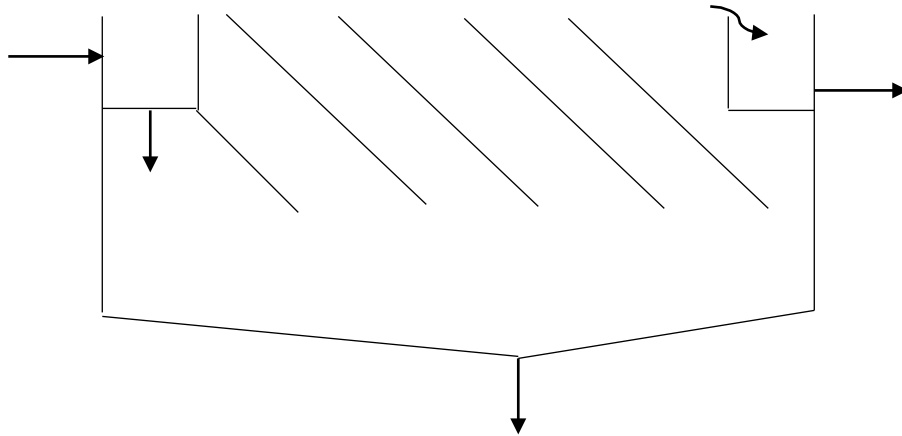
La centrifugación se realizó mediante una centrífuga modelo Rotina 380 de marca Hettich Lab de potencia 650 W y con una velocidad de rotación máxima de 4000 rpm.

El esquema 4 abajo resume el proceso de cultivo en continuo y de recuperación de la biomasa (tabla de puntos en Anexo 6).



*Esquema 4 – Esquema del proceso de cultivo en continuo y recuperación de la biomasa*

Se utilizó un sedimentador de placas porque esos sedimentadores presentan una buena eficiencia, permiten tratar volúmenes grandes con una superficie extendida menor que un sedimentador sencillo. En efecto, las placas aumentan la superficie del sedimentador y cancelan la velocidad horizontal de las partículas lo cual favorece la sedimentación de esas. El esquema 5 abajo presenta el sedimentador con placas, las flechas representan la circulación de los flujos de los varios efluentes.



Esquema 5 – Sedimentador placas con la circulación de los efluentes

En las siguientes tablas se observan las dimensiones del sedimentador y la configuración de operación durante el experimento.

Dimensiones sedimentador	
Longitud (m)	0.295
Anchura (m)	0.2
Altura (m)	0.199
Volumen (m <sup>3</sup> )	1.17E-02
Superficie (m <sup>2</sup> )	3.98E-02
Superficie con placas (m <sup>2</sup> )	1.44E-01
Número de placas	5

*Tabla 8 – Datos de diseño del sedimentador*



## 5.2. Métodos de Análisis

Cada día se tomó una muestra de la cual se analizó la concentración de la biomasa, el pH, el contenido en nitratos del medio, el contenido de lípidos, de carbohidratos, de clorofila y el contenido en proteínas de la biomasa. A continuación se detallarán los métodos de cada análisis.

### 5.2.1. *Determinación de la concentración de la biomasa en el FBR*

La concentración de la biomasa se midió por peso seco: se filtraron 10mL de muestra con membranas de 0.45µm o 0.8µm de porosidad y se dejó secar el filtrado 24h en un horno a 70°C. Luego, la concentración se calculó de la siguiente forma:

$$C_{FBR} = (m_f - m_i) * 100 = m_b * 100$$

Con  $m_i$  la masa de la membrana y del aluminio en gramos,  $m_f$  la masa de la misma membrana y aluminio con la microalga seca y  $m_b$  la masa de la biomasa seca.

Se puede medir la concentración por medio de la espectrometría pero no se puede para altas concentraciones porque el error es más elevado.

$$y = 0.715x + 0.0301 \text{ A una longitud de onda de 750 nm;}$$

$$y = 0.715x + 0.0301 \text{ A una longitud de onda de 665 nm;}$$

Con  $x$  el valor de la absorbencia (promedio de 3 repeticiones) mientras que  $y$  la concentración de la biomasa; si se realiza una dilución para medirlo con el espectro hay que multiplicar  $y$  por el valor de la dilución

### 5.2.2. *Determinación de los parámetros cinéticos asociados a la biomasa : la productividad y la velocidad de crecimiento*

La velocidad de crecimiento es función de la concentración de la biomasa y se determinó con la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0}$$

Con  $X_0$  la concentración inicial de la biomasa al tiempo  $t_0$  y  $X_t$  la concentración de la biomasa al tiempo  $t$ . La velocidad máxima,  $\mu_{max}$  se calculó del cultivo como el promedio de las velocidades durante la fase exponencial de crecimiento.

La productividad se determinó como productividad máxima según la ecuación siguiente [54]:

$$P_{max} = \frac{X_t - X_0}{t - t_0}$$

### 5.2.3. *Determinación de la concentración en nitratos del cultivo*

La concentración en nitratos se midió por espectrometría. Para ello se puso en 2 tubos Eppendorf 2 mL de muestra, se centrifugaron por 3 minutos a 13 000 rotaciones por minuto; se filtró el sobrenadante con un filtro de 0.2 µm con una jeringa. Según el tiempo en el cual fue tomada la muestra, hay que diluir la muestra con agua destilada (como al inicio la microalga no ha consumido nitrato, se debe diluir en 1/100 las primeras muestras del cultivo dicha en la va disminuyendo con el tiempo. Hacer 3 diluciones a partir del mismo sobrenadante y agitar). Se tomaron 2 mL de la muestra diluida y se mezcló con 1 mL de ácido clorhídrico y agitar. Esa mezcla se leyó en el espectrómetro a 220 nm. Se hace un blanco con agua destilada. Una vez obtenido el promedio de la absorbancia de las diluciones de una muestra se obtiene la concentración en nitratos a partir de la curva patrón siguiente:

$$y = 0,1789 * x + 0,01324$$

$$x = \left( \frac{y - 0,01324}{0,1789} \right) * \text{Factor de dilución}$$

Con y la absorbancia y x la concentración en nitratos en µg/mL

### 5.2.4. *Determinación de la cantidad de lípidos*

La cantidad de lípidos se determinó por fluorometría con el método del rojo de Nilo [55]. Se tomaron 20 µL de muestra a lo cual se añade 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente se agitó la mezcla durante 1 minuto, se tapó el tubo y se puso a calentar por 1 minuto en el microondas. Se dejó enfriar la mezcla para que no se pierda el DMSO por evaporación. Se añadieron 20 µL de acetona de rojo de nilo (a 250 mg/L) y se calentó otra vez en el microondas durante 50 s. Se dejó enfriar para que no se evaporara una parte de la mezcla (el acetona es muy volátil). Se tuvo que enfriar rápidamente para no perder la propiedad fluorométrica del rojo de nilo. Se completó con agua destilada hasta obtener un volumen total de 1 mL, se agitó y se puso rápidamente en la oscuridad 10 minutos. Después, se completó con 1 mL de agua destilada, se agitó y se midió en el fluorómetro. Se realizó un blanco con 20 µL de muestra completado con 1.98 mL de agua destilada. Igual que para los nitratos, se usa una curva patrón para determinar la concentración en lípidos a partir de la medida fluorométrica:

$$y = 6.10^{-6} * x + 9,2713$$

Donde x en URF (al cual se le resta el valor del blanco) y y el contenido en lípidos de una microalga en porcentaje de biomasa seca. Se obtiene la concentración en lípidos en mg/L multiplicando y por la concentración de biomasa correspondiente.

### 5.2.5. *Determinación del contenido en proteínas*

La cantidad de proteínas se determinó por espectrometría. Se pueden realizar 2 métodos diferentes para liberar las proteínas: por hidrólisis (Método 1, [56]) o por disrupción (Método 2).

Método 1: Se toma 1 mL de muestra que se centrifuga 5 minutos a 13 000 revoluciones por minuto. Posteriormente se retira el sobrenadante y se añade 2 mL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) a 0.2M. La hidrólisis se realiza calentando a 100°C con agua hirviendo en baño María durante 20 minutos. Una vez enfriado, se centrifuga de nuevo a 13 000 rot/min durante 5 mins. (\*) Se toman 200 µL de la solución hidrolozada y se le añaden 100 µL del reactivo A y se completa con 800 µL de reactivo B. Se agita y se pone 15 minutos a la oscuridad. Se prepara un blanco con 200 µL de NaOH con 100 µL de reactivo A y 800 µL de B, se agita. Después se realiza la espectrometría a 750 nm.

Método 2: Mezclar 1 mL de muestra con 500 mg de perlas de disrupción (Diámetro de 0.5 mm) en tubo para disruptor. Poner en el disruptor 3 minutos. Luego dejar enfriar y centrifugar 5 minutos a 13 000 rpm. Repetir los pasos señalados a partir del asterisco (\*) del Método 1. El blanco se hace con agua destilada en lugar de NaOH.

Se usa la curva patrón siguiente para determinar la concentración,  $y$  (en  $\text{mg}_{\text{prot}}/\text{mL}_{\text{extracto}}$ ), a partir del promedio de las absorbancias,  $x$ , de una muestra:

$$y = 0,774 * x$$

Se obtiene la cantidad de proteína por volumen de cultivo ( $\text{mg}/\text{L}_{\text{cultivo}}$ ) multiplicando  $y$  por el volumen de extracto y dividiendo entre el volumen de cultivo centrifugado. Dividiendo eso por la concentración de biomasa se obtiene el contenido en porcentaje de biomasa seca.

#### 5.2.6. *Determinación del contenido en carbohidratos (CHO)*

La cantidad de carbohidratos se midió por espectrometría usando el método de Fenol-Ácido sulfúrico [57]. Para poder medir en el espectrómetro los carbohidratos se deben realizar los siguientes pasos: Se tomó 1 mL de medio de cultivo. Se agregaron 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 1M. Se agitaron y se colocaron en un baño ultrasónico durante 20 minutos. Luego, se puso en un baño maría a 100°C durante 1 hora donde se realizó una hidrólisis ácida. Después, se centrifugó por 20 minutos a 4000 rpm. Se tomaron 500 µL del sobrenadante y se le añadieron 500 µL de fenol al 5% (peso (g)/volumen (mL)), se agitó y se dejó reaccionar por 40 minutos. Se agregaron 2.5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado que se dejaron enfriar. Se realizó un blanco con 500 µL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 1M, 500 µL de fenol al 5% y 2.5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Se midió en el espectro con una longitud de onda de 485 nm.

Se usó la curva patrón siguiente para determinar la concentración  $y$  ( $\mu\text{g}_{\text{CHO}}/\text{mL}_{\text{extracto}}$ ):

$$y = 0.0087 * x + 0.0212$$

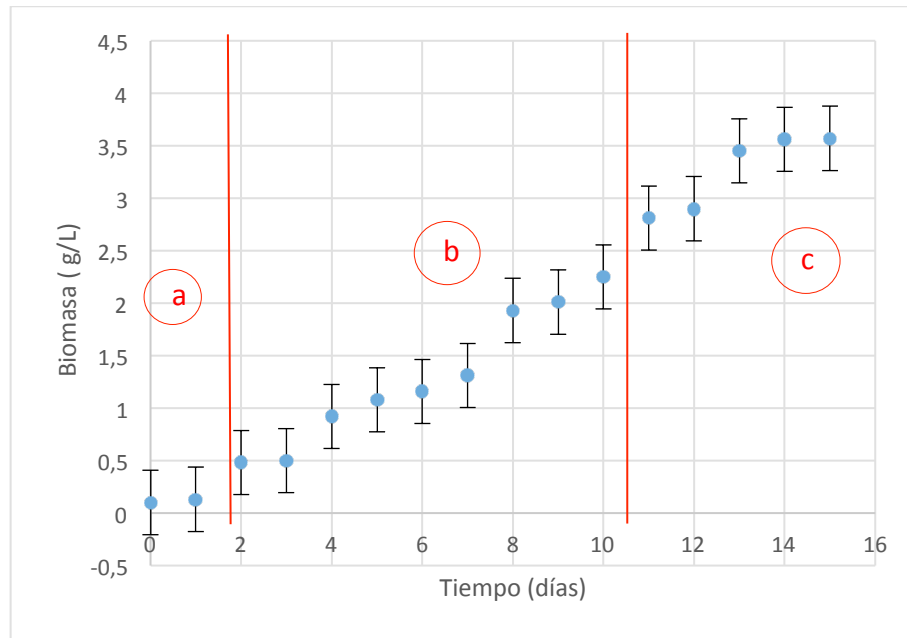
Se obtuvo la cantidad de carbohidratos por volumen de cultivo ( $\text{mg}/\text{L}_{\text{cultivo}}$ ) multiplicando  $y$  por el volumen de extracto y dividiendo por el volumen de cultivo centrifugado. Dividiendo eso por la concentración de biomasa se obtiene el contenido en porcentaje de biomasa seca.

## 6. Resultados

### 6.1. Cultivo por lote

#### 6.1.1. Evolución de la concentración en biomasa del cultivo batch

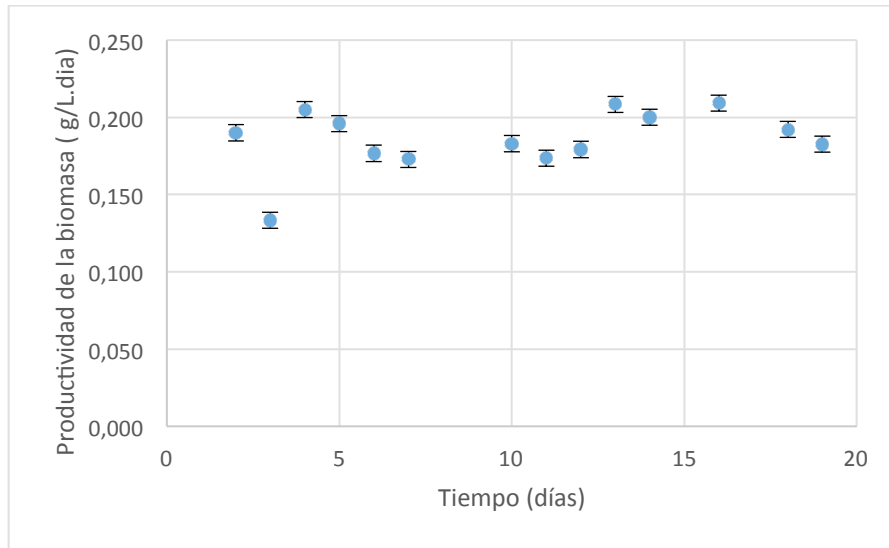
El cultivo se realizó durante la temporada de otoño -de noviembre a diciembre-. Se obtuvieron los resultados siguientes:



*Figura 8 - Evolución de la concentración de la biomasa a lo largo del tiempo en el fotobioreactor en lote*

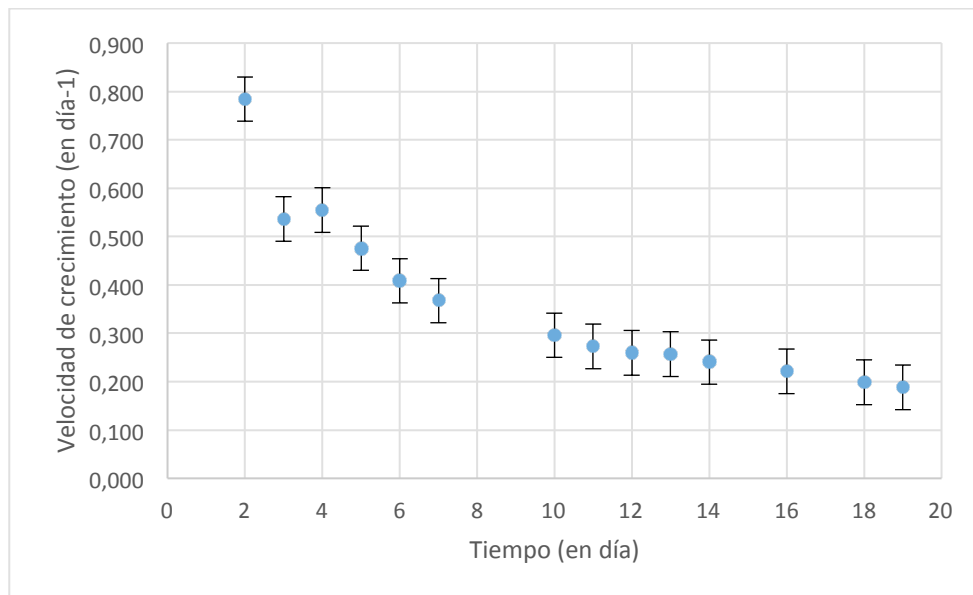
En la curva (Figura 8) se puede distinguir las 3 etapas de toda curva de crecimiento: la fase aclimatación, **a**, la fase de crecimiento exponencial, **b**, y la fase estacionaria, **c**. [52], [53], [58].

### 6.1.2. Evolución de la tasas de crecimiento del cultivo



*Figura 9 - Evolución de la productividad de la biomasa a lo largo del tiempo en el fotobioreactor en lote*

Se puede observar que la productividad se mantiene relativamente constante a lo largo de los días hasta que el cultivo alcanza su concentración máxima (día 19 de la figura 9). Posteriormente, la concentración se mantiene constante. Entre el día 5 y el día 12 se corresponde al inicio de la fase de crecimiento exponencial, incluso está un poco debajo del resto de la curva. Entonces aumenta la productividad cuando más aumenta la concentración en biomasa (día 13 hasta el día 18). Sin embargo, el día 3 es un punto peculiar puesto que aún corresponde a la fase inicial conjunto a un día con pocas horas de luz (confiere curva de luminosidad anexo 1).

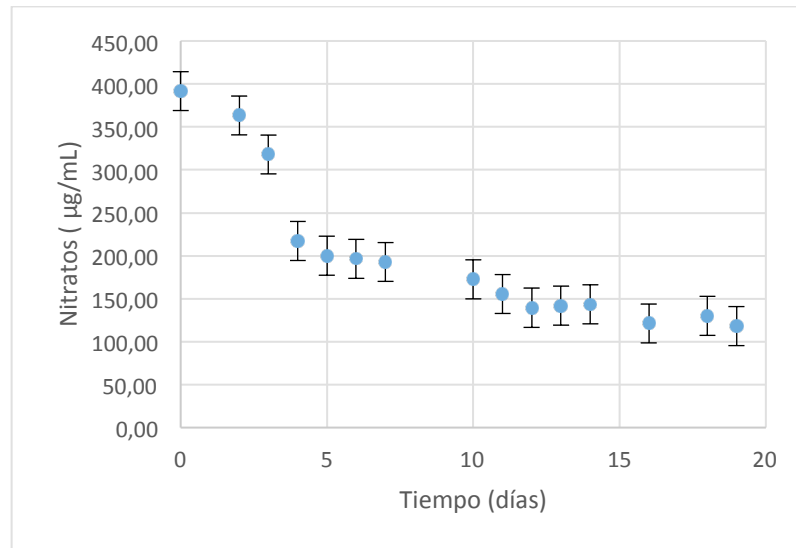


*Figura 10 - Evolución de la velocidad de crecimiento de la microalga a lo largo del tiempo en el fotobioreactor en batch*

La velocidad de crecimiento está relacionada con la concentración en el reactor. Como se puede apreciar en la figura 10 entre más concentrado esté el cultivo, menor será la velocidad de crecimiento. xx

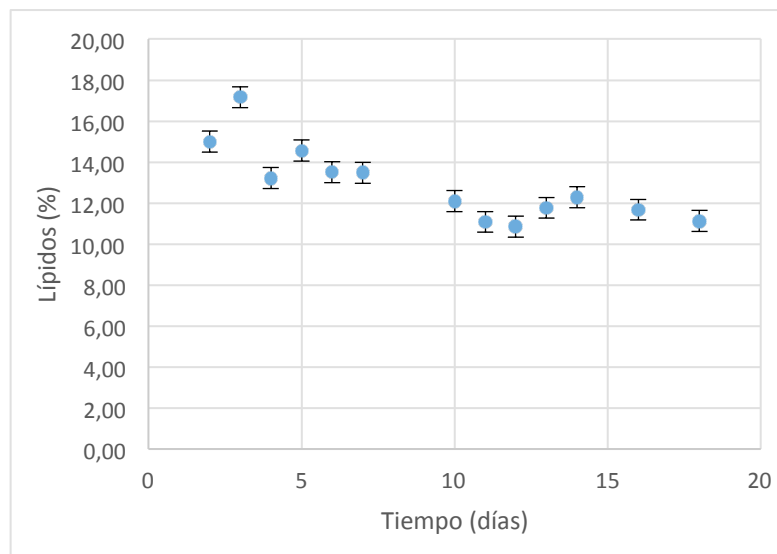
### 6.1.3. Evolución de la concentración en nitratos en el cultivo

El crecimiento de la microalga está asociado al consumo de nitratos, como se puede observar en la figura 11. Pasando de un valor de alrededor 400  $\mu\text{g/mL}$  a alrededor de 125  $\mu\text{g/mL}$ .



*Figura 11 - Evolución de la concentración en nitrato en el cultivo a lo largo del tiempo en el fotobioreactor en lote*

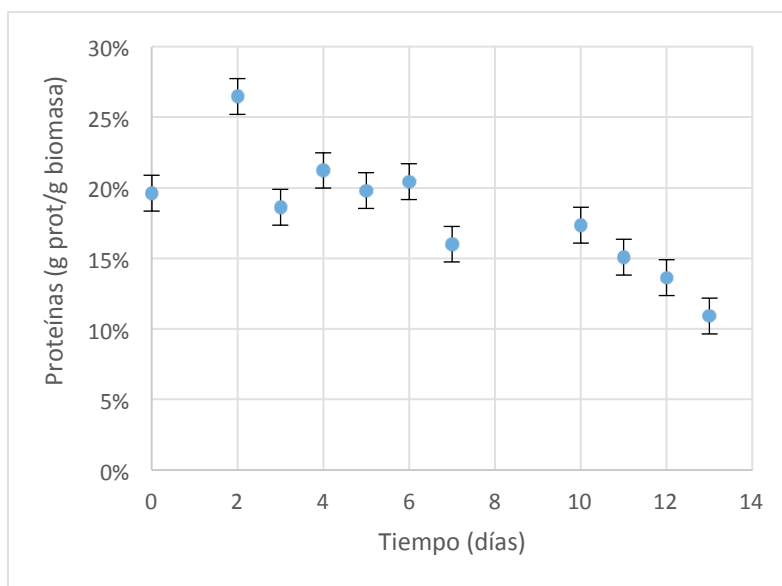
### 6.1.4. Evolución del contenido en lípidos



*Figura 12 - Evolución del contenido en lípidos de la microalga durante el periodo de cultivo*

Se obtuvieron resultados parecidos a los de [52]. Sin condiciones de limitación, la microalga acumuló alrededor de 13% (en peso seco de biomasa) de lípidos, que se mantiene constante a lo largo del cultivo.

### 6.1.5. Evolución del contenido en proteínas



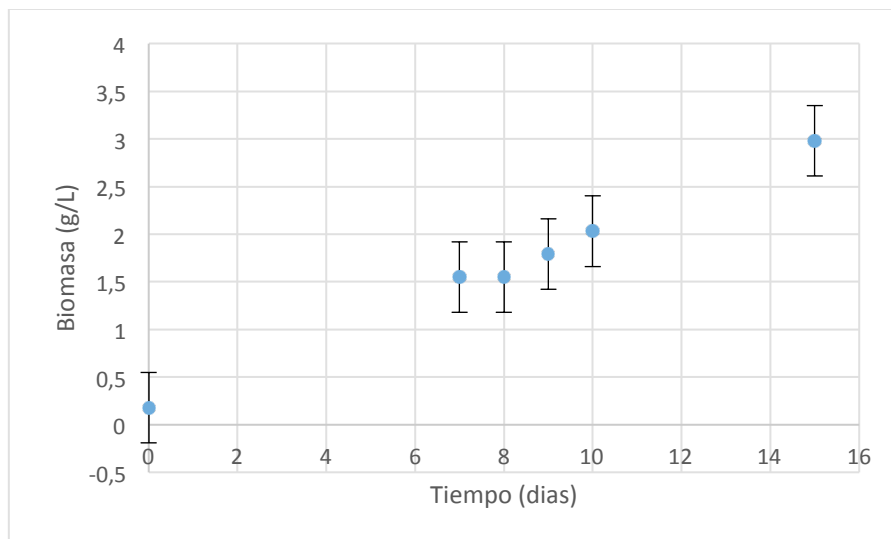
*Figura 13 - Evolución del contenido en proteínas de la microalga*

Observamos una disminución en el contenido en proteínas. En efecto, al inicio del cultivo, debido a una alta concentración en nitratos, la microalga va acumular más compuestos que llevan nitratos, es decir: proteínas. Como los nitratos disminuyen a lo largo del tiempo, la respuesta de la microalga es de favorecer la acumulación de otros compuestos, compuestos energéticos de reserva (que son los lípidos y carbohidratos).

## 6.2. Cultivo semi-continuo

Primero se inoculó el FBR de manera igual que para un cultivo en lote. Se dejó crecer unos 10-15 días según la temporada y el clima. En la figura xx se presenta la curva de crecimiento antes de pasar al modo de operación semi-continuo. El término semi-continuo se refiere al hecho que como el cultivo está en condiciones de la intemperie y que la microalga crece solo en presencia de luz, la operación del sistema se detiene durante la noche. Para operar en continuo, se requiere el uso de bombas para alimentar el cultivo con medio fresco (BG11, tabla 7 en condición normales). Así como se puede observar, la curva es similar a los resultados precedentes (parte 6.1, [52], [53], [58]). El cultivo se dejó crecer hasta 3 g.L<sup>-1</sup>. Posteriormente y a partir de los datos de velocidad de crecimiento del cultivo en lote, se buscó establecer las condiciones que permitieran tener la velocidad de crecimiento mayor ( $\mu_{\max} = 0.555 \text{ día}^{-1}$  según la figura xx). A partir de ese dato se determinó la tasa de dilución y el flujo de cultivo que se podía extraer del sistema. La velocidad de crecimiento está calculada sobre 24h pero la microalga crece solo durante el día. Se dividió esa velocidad por 11 horas (más o menos el número de horas de sol en invierno en México DF) y luego se multiplicó por el volumen del cultivo cual es 24 L. Se obtuvo la tasa de dilución o sea el flujo de cultivo a extraer y de medio

fresco a introducir al FBR. El problema de establecer la tasa de dilución con base a su valor máximo es que se corre el riesgo de diluir el cultivo, porque la velocidad de crecimiento depende en parte de la penetración de la luz, que depende de la biomasa en el sistema cual disminuye conforme aumenta la concentración.



*Figura 14 - Evolución de la concentración de la biomasa en el tiempo en el fotobioreactor antes de pasar en modo continuo*

En consecuencia se tiene que buscar una tasa de dilución adecuada al sistema en la cual se mantenga una concentración constante de la biomasa en el FBR. A partir del  $\mu_{\max} = 0.555 \text{ d}^{-1}$  encontrado en el experimento en lote se calculó una tasa de dilución de 19 mL/min. Abajo se presentan las tablas 9 y 10 en las cuales se reportan la evolución de la concentración de la biomasa en la operación en cultivo en continuo (en la salida que es equivalente) para dos tasas de diluciones diferentes. La primera tabla se hizo a partir de la la tasa de dilución calculada a partir la tasa de crecimiento máxima. Se pudo constatar que el cultivo se fue diluyendo. Por lo que fue necesario de reducir la tasa de dilución para que se mantuviera constante la concentración de biomasa.

Tiempo (h)	$C_{\text{FBR}}$ (g/L) a la salida de la columna
0	2.98
2	2.12
4	1.96
6	1.82
8	1.84

*Tabla 9 - Evolución de la concentración de la biomasa en el tiempo en el FBR en modo continuo para un tasa  $D_1 = 19 \text{ mL/min}$*

La segunda tabla presenta la concentración de biomasa para una tasa de dilución de 13 mL/min y basado en la velocidad de crecimiento promedio de la fase de crecimiento  $\mu_{\max\text{-promedio}} = 0.357$ . Como se



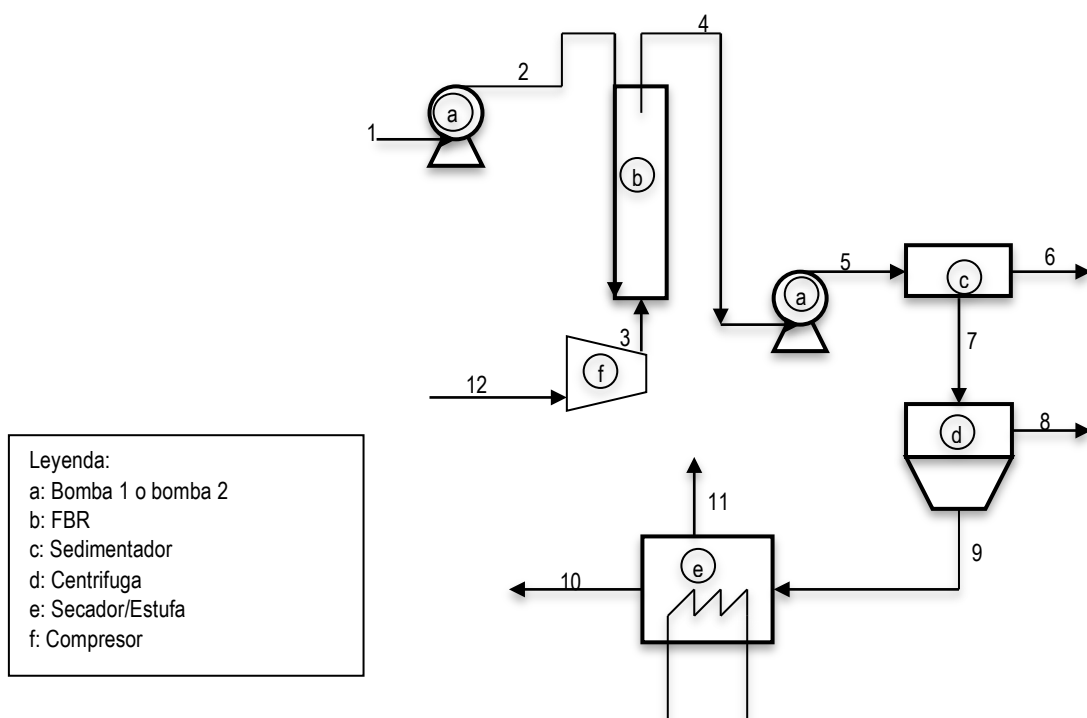
puede observar, al inicio del experimento la biomasa se diluye un poco, pero al final el valor se estabiliza alrededor de 1,2 g/L.

Tiempo (h)	$C_{FBR}$ (g/L) a la salida de la columna
0	1.62
2	1.44
4	1.42
7	1.2
8	1.16
10	1,14
12	1,18

*Tabla 10 – Evolución de la concentración de la biomasa en el tiempo en el FBR en modo continuo para un flujo de alimentación de  $D_2 = 13 \text{ mL/min}$*

Ese flujo se consideró como el flujo de dilución, porque un flujo mayor diluye el cultivo y por lo tanto disminuye de mucho su productividad. Al contrario una tasa menor permitiría alcanzar mayor concentraciones pero como lo que sale del cultivo es muy bajo en volumen, la productividad disminuye también.

Una vez que se encontró la tasa de dilución óptima el FBR se trabajó en continuo a ese flujo de alimentación de 13 mL/min se logró mantener la concentración de biomasa constante a la salida del reactor, lo cual significa que la tasa de crecimiento de la biomasa y la tasa de dilución son iguales y por tanto el sistema se encuentra en estado estacionario. Se obtuvo resultados parecidos al [52]. Bajo estas condiciones es necesario implementar un sistema que permita la continua recuperación de biomasa. En el esquema 6 se muestra un esquema teórico que integra la parte de producción y recuperación de biomasa. La parte de producción incluye los puntos 1, 2, 3, 4, 5 y 12 y la de recuperación todos los demás puntos. Este esquema sirvió de base para el planteamiento del balance de energía que se presenta en la sección 6.5.



*Esquema 6 – Esquema del proceso de cultivo en continuo y recuperación de la biomasa*

A continuación se presenta la caracterización de un sedimentador que se incorporó al sistema de cultivo

### 6.3. Experimentos de sedimentación

Se realizaron varios experimentos (en probeta en sedimentador y de placas) con la finalidad de estudiar la sedimentación de la biomasa microalgal en diferentes configuración..

#### 6.3.1. Tiempo sedimentación teórica para una microalga

En un primer paso, se determinó la velocidad de sedimentación de manera teórica gracias a la ley de Stokes:

$$v_s = \frac{2 * r^2 * g * (\rho_p - \rho_f)}{9 * \mu}$$

Con  $r$ , el radio de la partícula (radio de una microalga) en m,  $g$  la gravedad en  $m/s^2$ , las masas volumétricas  $\rho_p$  y  $\rho_f$  respectivamente de la partícula y del fluido en  $kg/m^3$  y  $\mu$  la viscosidad dinámica del fluido en  $Pa/s$  (o  $kg/m.s$ ).

Para lo anterior se asumió que la microalga es una esfera y no tiene interacción con el medio ambiente y se supuso que la microalga está en su fase estacionaria.

En la tabla 11 se encuentra la velocidad de sedimentación de la microalga.

$\rho_p(\text{kg/m}^3)$	1145.9
$\rho_f$ (a 20°C, kg/m <sup>3</sup> )	998
$r$ (m)	5.00E-06
$\mu$ (m <sup>2</sup> /s)	1.00E-03
$g$ (m/s <sup>2</sup> )	9.81
$v_s$ (m/s)	8.06E-06
$v_s$ (m/min)	4.84E-04
$v_s$ (m/h)	0.029
$v_s$ (m/día)	0.696

*Tabla 11 – Recapitulación de los valores utilizados para la determinación de la velocidad de sedimentación*

Como se pueden observar en las últimas 4 filas de la tabla, las velocidades de sedimentación son bastante bajas debido al tamaño de la partícula. Para recorrer 30cm se necesitarían teóricamente unas 10 horas.

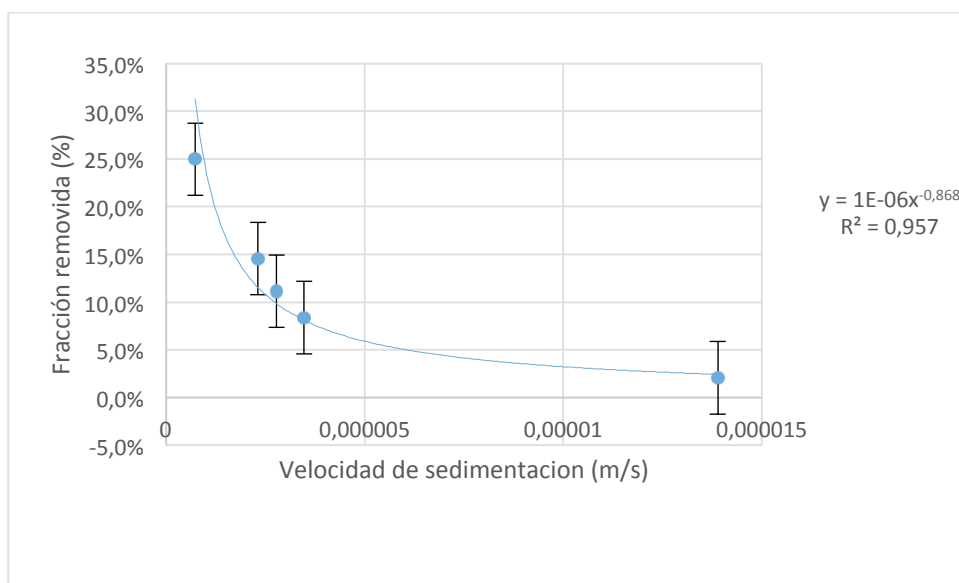
### 6.3.2. Sedimentación en probetas

Para comprobar la teoría (ley de Stokes para partículas inertes) en el caso de un ser vivo, se realizaron experimentos de sedimentación en probetas con un cultivo de microalgas en fase de crecimiento que se encontraba a una concentración 0.4 g/L.

Se midió la concentración a 5cm de la superficie al inicio y cada hora durante las 6 primeras horas y luego después de 13 horas. Se calculó la fracción removida mediante la ecuación siguiente:

$$\%Remoción = \frac{C_i}{C_0} \text{ con } C_i \text{ la concentración en g/L al tiempo } t_i \text{ y } C_0 \text{ la concentración inicial en g/L;}$$

Luego, se calculó la velocidad de asentamiento como:  $v_s = \frac{h}{t_i}$  en m/s con  $h$ , en m, la altura ( $h=5\text{cm}$ ) y  $t_i$  el tiempo en segundos.



*Figura 15 - Evolución del % de remoción de la biomasa a 5 cm de la superficie en función de  $v_i$  en probetas a partir de las aguas residuales del sedimentador del cultivo en continuo*

Se puede observar que a priori la remoción completa parece difícil de lograr en tiempos cortos (velocidad inferior a  $0.7 \mu\text{m/s}$ ). Eso justifica la necesidad de un sedimentador con placas, para disminuir la superficie necesaria para sedimentar. También, se observó que después de unos días después del experimento una parte de las microalgas ya no se sedimenta. Eso significa que o la microalga por ser joven tiene una masa volumétrica inferior al agua o (también por su edad) tiene interacciones con su medio que hace que se mantenga suspendida dentro del medio. Se puede explicar por el hecho de la edad de la microalga. En efecto, una microalga joven tiene un tamaño inferior al tamaño tomado para calcular la velocidad de sedimentación con Stokes ( $r=5 \cdot 10^{-6}\text{m}$ ). También como estamos en presencia de un ser vivo, otros parámetros como el pH, la composición de la microalga, el tipo de cultivo como en limitación, la edad de la microalga [48], [63]. Los cuales afectan su masa volumétrica y su comportamiento en el medio, pero aún no existe algún modelo de sedimentación que considere estos aspectos.

De igual manera se realizó un experimento de sedimentación en tubos Falcon con un pulso de pH para estudiar el comportamiento de la microalga ante cambios de pH. El experimento se realizó con 6 tubos falcon: un par con pulso a pH ácido (pH=5), un par con pH neutro (entre 7 y 8) y un par con pulso a pH básico (pH entre 9 y 11). Después de 15 mins se notó una diferencia en la velocidad de sedimentación: los que recibieron el pulso (ácido o básico) sedimentaban más rápido (Zona clarificada a partir de la graduación 40/45 contra 50 para el par sin pulso). Eso confirma nuestras hipótesis precedentes y lo que fue reportado en [48], [63].

### 6.3.3. Sedimentación en un sedimentador cónico

Adicionalmente realizó un experimento con un sedimentador cónico con un volumen de 10L en modo lote. Se midió la concentración a 5 cm de la superficie y a 27 cm (que es más o menos la mitad) una vez en la mañana y una vez en la tarde. Se calculó la velocidad de sedimentación (m/h) por la zona de esa manera:

$$v_i = \frac{h}{t_i}$$

Con  $h=0.05$  m o  $0.27$  m según la altura que nos ponemos y  $t_i$  el tiempo en horas ( $t_1=8h$ ;  $t_2=24.25h$ ;  $t_3=31.75h$ ).

Para cada tiempo se calculó la turbiedad (o concentración) removida así:

$$\%Remocion\ turbiedad = \frac{C_0 - C_i}{C_0}$$

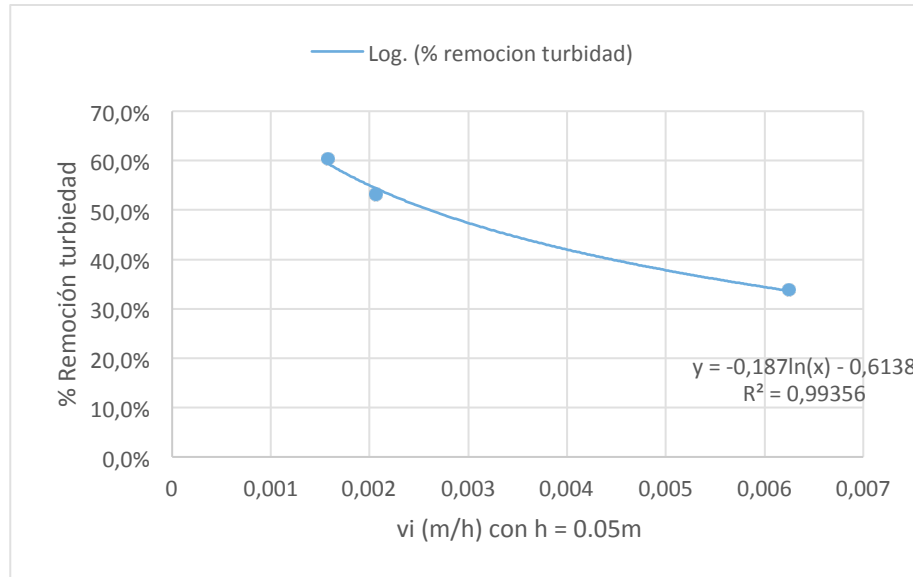
Con  $C_0$  la concentración inicial ( $C_0=0,28g/L$ ) y  $C_i$  la concentración al tiempo  $t_i$ .



Figura 16 – Sedimentador cónico

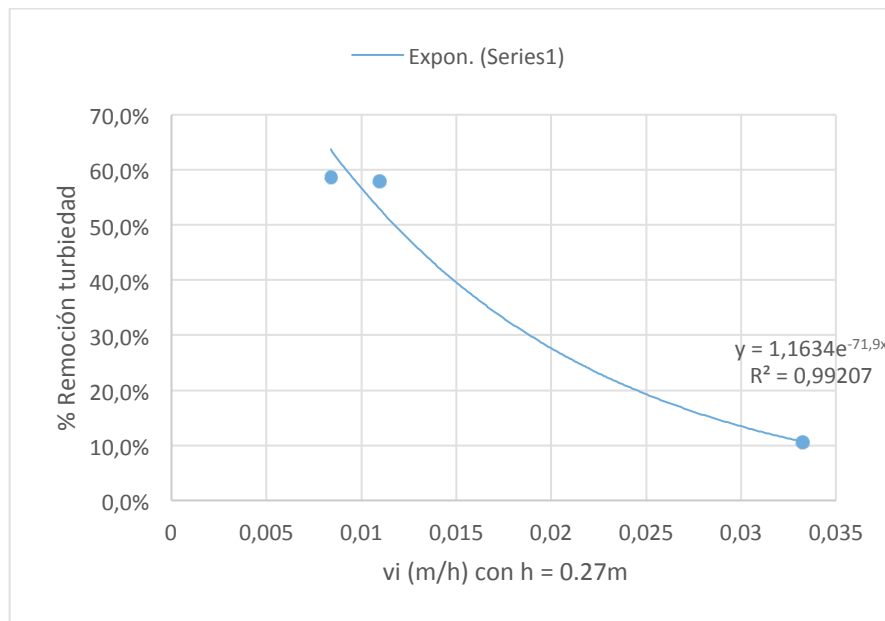
La figura 16 presenta el sedimentador conico usado para el experimento.

Se obtuvieron los resultados siguientes:



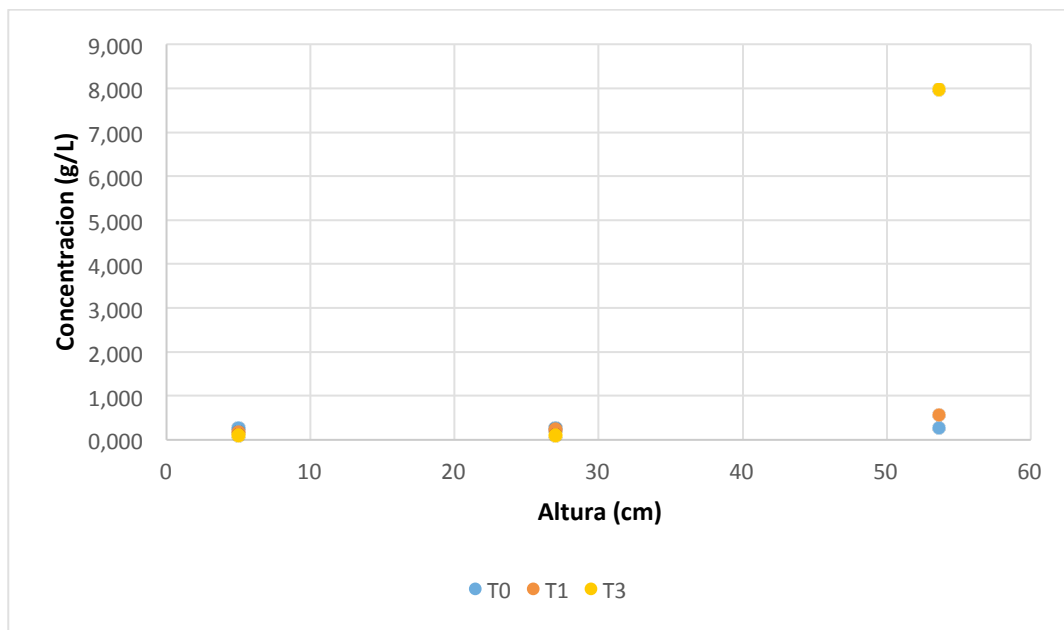
*Figura 17 - Evolución del % de remoción de la biomasa a 5 cm de la superficie en función de  $v_i$*

La línea de tendencia es válida sólo para esa curva y entre esos puntos. En efecto, la curva tiene una asíntota al inicio (entre  $v_i=0$  y  $v_i=0.0016$  m/s). Este experimento nos confirma la necesidad de usar un sedimentador con una configuración que permite inducir una sedimentación más rápida. En efecto, para remover el 60,4% ( $v_i=0.00157$  m/h) de la biomasa hay que esperar 32 horas. Esa velocidad de sedimentación es muy inferior a su valor teórico. En efecto, el cálculo de la velocidad de sedimentación con la ley de Stokes no toma en cuenta algunos parámetros como la edad de la microalga (en este experimento, la microalga fue recuperada en su fase de crecimiento exponencial tamaño menor, peso menor), su interacción con el medio ambiente (carga positivas/negativas, absorción de gas disuelto, emisión de gas), su flotación por acumulación de ciertas moléculas



*Figura 18 - Evolución del % de remoción de la biomasa a 27 cm de la superficie en función de  $v_i$*

Lógicamente, obtenemos resultados parecidos para una mayor altura.



*Figura 19 – Concentración en función de la altura ( $h=5; 27; 53.6\text{cm}$ ) a un tiempo  $t_0, t_1, t_3$  (0, 8 y 31,75 horas)*

Obviamente, se observa que conforme más tiempo pasa más se concentra la biomasa en el fondo. Se observa igualmente que después de 32 horas, la concentración a 5 y 27 cm son casi igual.

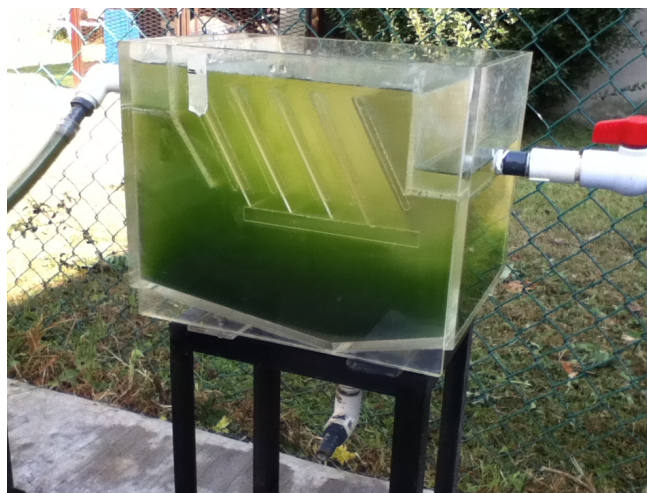
Esas 3 curvas, figuras 17 a 19, son construidas basado en lo de [64] y son parecidas a las obtenidas por [64].

#### 6.3.4. Estudio comportamiento sedimentador de placas

A partir del lote obtenido en el primer experimento de cultivo, se realizaron ensayos para caracterizar el sedimentador de placas. Fue usado un sedimentador de placas porque es un sedimentador teóricamente más eficiente. Igual que no sería más eficiente, ese tipo de sedimentador permite trabajar en continuo y con una productividad mayor ya que le podemos imponer flujos más altos que un sedimentador tipo cónico donde sola la gravedad induce la sedimentación. En consecuencia la sedimentación por gravedad impone la velocidad de sedimentación y por lo tanto el flujo. El uso de las placas permite disminuir la superficie horizontal necesaria del sedimentador reduciendo la velocidad horizontal de las partículas y favoreciendo su sedimentación. Se tomaron muestras para comprobar que el sedimentador realizaba su función: separar y concentrar la biomasa. El experimento se realizó de la siguiente forma: el sedimentador empieza lleno de agua, por lo que al principio el cultivo se diluye hasta reemplazar todo el volumen del sedimentador (11.74 L aproximadamente).

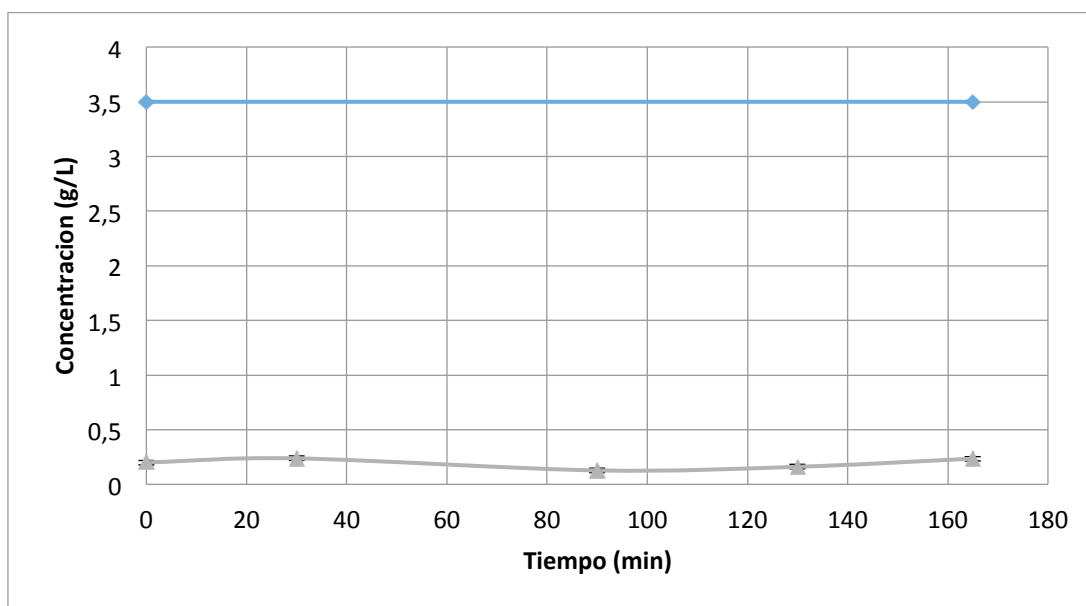
<b>Volumen de cultivo a tratar, <math>V_{tot}</math> (L)</b>	<b><math>\approx 12</math></b>
<b>Flujo entrada sedimentador (mL/min)</b>	<b>25</b>
<b>Flujo salida agua residual (mL/min)</b>	<b>17-19</b>
<b>Flujo salida biomasa (mL/min)</b>	<b>6-8</b>
<b>Tiempo de residencia, <math>t_{res}</math> (min)</b>	<b>400.00</b>
<b>Tiempo de residencia, <math>t_{res}</math> (h)</b>	<b>6.7</b>

*Tabla 12 – Configuración sedimentador experimento con lote*



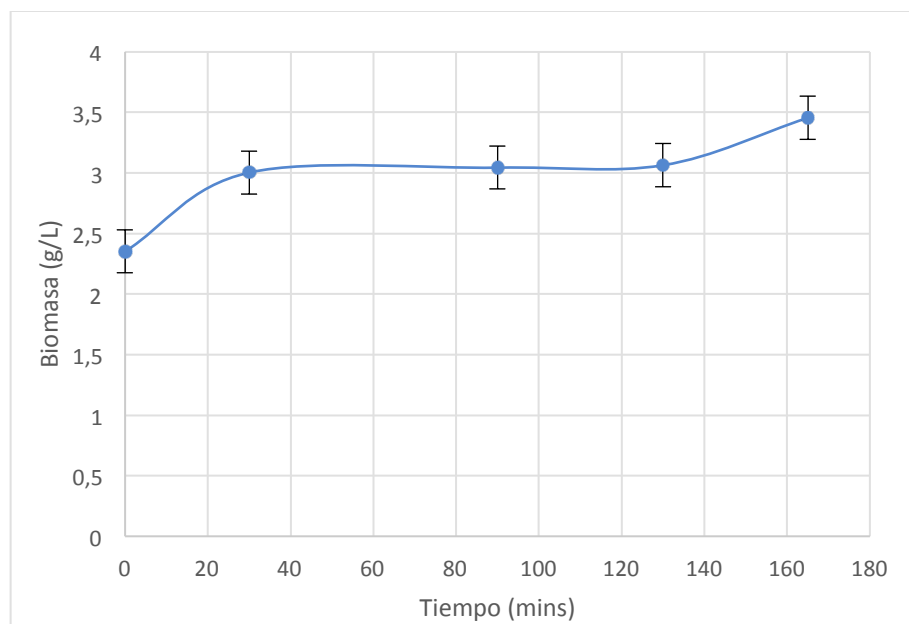
*Figura 20 – Sedimentador de placa*





*Figura 21 - Evolución de la concentración de la biomasa a la salida de efluente líquido del sedimentador (curva gris) y en la entrada (curva azul)*

Para este experimento no fue posible tomar más muestras y alcanzar el estado estacionario durante suficiente tiempo. Aunque se puede observar que la concentración en la salida de agua residual se mantiene relativamente baja y constante (figura 21). El sedimentador funciona correctamente y realiza su trabajo de separación.



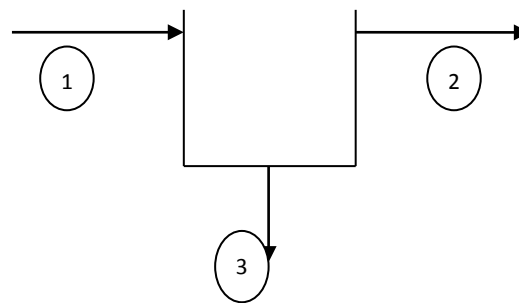
*Figura 22 - Evolución de la biomasa en la salida del fondo del sedimentador*

En primer lugar, debido a la dilución necesaria para reemplazar el volumen del sedimentador, la concentración en biomasa es inferior a la concentración del cultivo (confiere concentración del día 15 de la

figura 8 de 3,5 g/L). Al final del experimento, la concentración de la salida de biomasa alcanza el valor que se encuentra en el reactor (figura 22). En teoría, la concentración debería seguir aumentando. Pero existe otro fenómeno debido al diseño del sedimentador que tiene un fondo con poca inclinación para la salida de biomasa lo cual induce una acumulación de biomasa por sedimentación en el sedimentador (figura 24). En efecto, se necesita una inclinación mínima de 65° para que no se pegue la microalga al fondo. Sería una pérdida fija puesto que si tendría una mejor configuración y si funcionara más tiempo el sedimentador, esa pérdida no aumentaría.

A partir de un balance de masa con los datos de funcionamiento del experimento se puede determinar la concentración teórica que deberíamos obtener en estado estacionario y con una concentración de biomasa en la salida parecida a la que obtuvimos en el experimento.

Balances:



Esquema 7 – Sedimentador

1: Entrada del sedimentador

2: Salida agua residual

3: Salida biomasa

Sabemos que:

$$\dot{V}_1 = \dot{V}_2 + \dot{V}_3 \quad (1)$$

Con  $\dot{m}_i = \dot{V}_i * \frac{\dot{C}_i}{1000}$  y con  $\dot{m}_i$  en g/min,  $\dot{V}_i$  en L/min y  $\dot{C}_i$  en g/L, de (1) se deduzca:

$$\dot{m}_1 = \dot{m}_2 + \dot{m}_3 \quad (2)$$

Sabiendo los caudales de cada punto y las concentraciones en biomasa de los puntos 1 y 2 se pueden determinar los flujos másicos y la concentración que se debería obtener gracias a las ecuaciones de balance precedentes (1) y (2) y obtenemos los valores reportados en la tabla 13.

Puntos	Caudal (mL/min)	Concentración (g/L)	Flujos máscicos (g/min)
1	25	3,5	0,0875
2	18	0,25	0,0045
3	7	11,86	0,083

*Tabla 13 – Datos por puntos del sistema Sedimentador*

Teóricamente deberíamos obtener una concentración de 11,86 g/L en el punto 3 o sea una concentración de 239%.

### 6.3.5. Sedimentador con placas en continuo con cultivo en continuo

Para este experimento se hizo crecer la microalga hasta la concentración deseada (2 g/L para este primer experimento). Posteriormente se operó el sistema en cultivo continuo y se acopló el sedimentador. Se trató de mantener la concentración constante basado en la tasa de dilución que se dedujo a partir de la velocidad de crecimiento y para mantener la operación del sedimentador en estado estacionario.



*Figura 23 – Sistema de cultivo FBR-CB a la intemperie en continuo con el sedimentador*

Para determinar la tasa de dilución, se tomó la velocidad de crecimiento que corresponde a la concentración que nos interesa o la velocidad de crecimiento promedio durante la fase exponencial que será nuestra  $\mu_{\max}$  y extrapolamos para obtener la concentración que corresponde a esa velocidad. Por ejemplo si queremos una concentración de 2g/L, la velocidad de crecimiento era de 0.273 d<sup>-1</sup> (conforme figura 8 y 10).

En realidad esa velocidad está calculada sobre 24 horas pero la microalga solo crece de día. De hecho, la velocidad real se obtiene dividiéndola por la duración de la presencia de sol (11 horas). Se obtuvo el valor siguiente de crecimiento:  $\mu_{\max}=0.05045 \text{ h}^{-1}$ . La tasa de dilución D se calcula así:  $D= \mu_{\max} * V_{\text{FBR}}$  lo que dió un flujo de 9.93 mL/min. Eso fue el flujo de entrada y salida en el cultivo y de entrada del sedimentador.

El sedimentador tiene un volumen de 12,33 L. La duración del día en esta temporada de otoño fue de 11 horas. En consecuencia se requiere un flujo mínimo de 19 mL/min. Pero con un flujo tan elevado no podemos mantener la concentración a 2 g/L que se podría ir diluyendo hasta la velocidad de crecimiento correspondiente a este flujo y mantenerse a este nivel (en este caso, para un  $D=19\text{mL/min}$ , corresponde una velocidad de crecimiento de  $\mu_{\max}=0.0475 \text{ h}^{-1}$  o sea  $\mu_{\max}=0.5225 \text{ d}^{-1}$ ; por extrapolación a partir de los valores de las figuras 8 y 10, la velocidad corresponde a una concentración de 0.99g/L).

En realidad la velocidad de crecimiento cambia a lo largo del año y con las condiciones climáticas diarias. También esa velocidad cambia a lo largo del día entonces se puede que la concentración sea menor o mayor según el cultivo, el momento de la medida, la temporada.

Se obtienen los resultados siguientes:

Tiempo (h)	$C_{\text{salida biomasa}} \text{ (g/L)}$
0	1.68
2	0.5
4	1.02
7	1.3
8	1.12

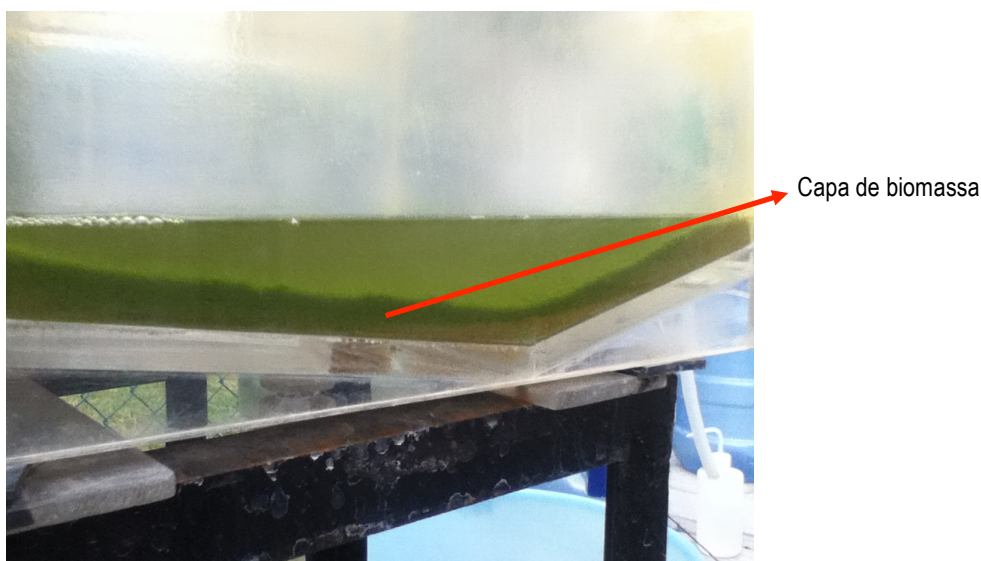
*Tabla 14 – Concentración de biomasa en la salida del sedimentador*

Tiempo (h)	$C_{\text{agua residual}} \text{ (g/L)}$
0	0.429
2	0.567
4	0.480
7	0.446
8	0.570

*Tabla 15 – Concentración en la salida de agua residual del sedimentador*

Se observa que la concentración en el reactor disminuye debido a que el flujo de alimentación es mayor que la velocidad de crecimiento de la microalga (al inicio del experimento con el sedimentador la concentración de biomasa fue 2 g/L) con una tasa de dilución que corresponde a una concentración de 1 g/L. Podemos notar que la concentración en la salida de biomasa del sedimentador es parecida a la concentración del cultivo. Excepto por la segunda medida de concentración ( $t=2$  horas). La salida se había un poco tapada y

solo el agua salió. Si la biomasa no sale más concentrada como lo debería es debido a la configuración del sedimentador que no permite un buen drenaje (ver figura 24) de la microalga concentrada que se pega al fondo del sedimentador y alrededor de la salida de biomasa. Mientras que la concentración de agua residual se mantiene relativamente constante que es lo que queremos.



*Figura 24 – Capa de acumulación de la biomasa en el sedimentador*

A partir de esos datos se puede realizar un balance teórico en lo que deberíamos obtener en la salida de biomasa:

El caudal de entrada de biomasa al sedimentador es de 19 mL/min. Se impone un caudal de 6 mL/min a la salida de biomasa y se deduce el caudal del agua residual, 13 mL/min con la conservación de los flujos (ecuación 1).

Calculamos los flujos másicos de la entrada del sedimentador y de la salida del agua residual. Con la ecuación (2), se deduce el flujo másico y la concentración correspondiente en la salida de biomasa.

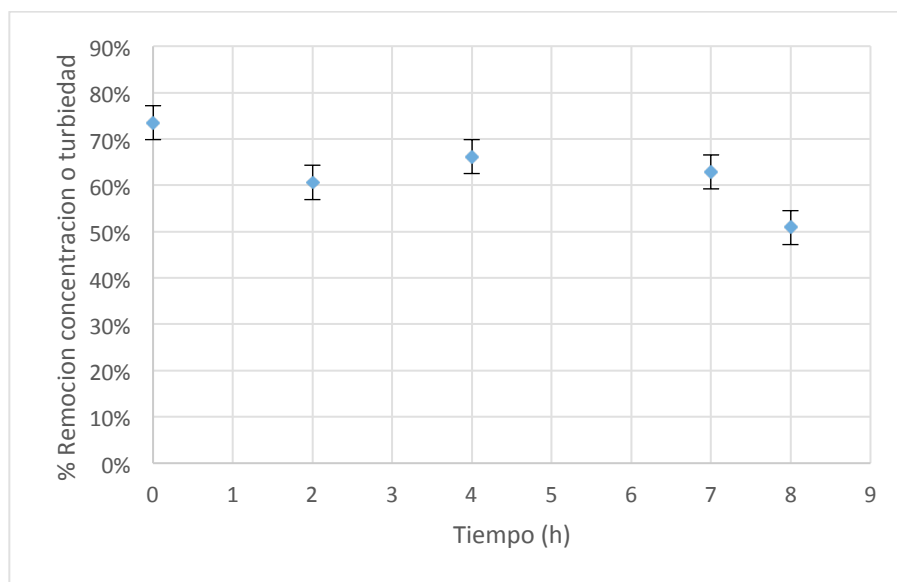
Concentración biomasa			Balance de masa teórico			Concentración teórica
Tiempo (h)	Salida FBR (g/L)	Salida Agua Residual (g/L)	Salida FBR (g/min)	Salida Biomasa (g/min)	Salida Agua Residual (g/min)	Salida Biomasa (g/L)
0	1.62	0.4293	0.03078	0.02520	0.00558	4.20
2	1.44	0.5673	0.02736	0.01998	0.00738	3.33
4	1.42	0.4804	0.02698	0.02073	0.00625	3.46
7	1.2	0.4455	0.02280	0.01701	0.00579	2.83
8	1.16	0.5700	0.02204	0.01463	0.00741	2.44

*Tabla 16 – Balance de masas y concentración teórica en la salida de biomasa*

Relación [Salida Biomasa]/[Entrada)	% Concentración
2.6	159%
2.3	131%
2.4	143%
2.4	136%
2.1	110%

*Tabla 17 – Relación Salida/Entrada de la biomasa y porcentaje de concentración*

Podemos concluir que aparte del problema de configuración del sedimentador, éste realiza bien su función de concentrar la microalga (concentra 2 veces más que en el cultivo). Se puede suponer una posible mejoría en la economía en términos de energía y de coste para recuperar la biomasa.



*Figura 25 –Evolución del porcentaje de biomasa removida (eficiencia del sedimentador) en función del tiempo*

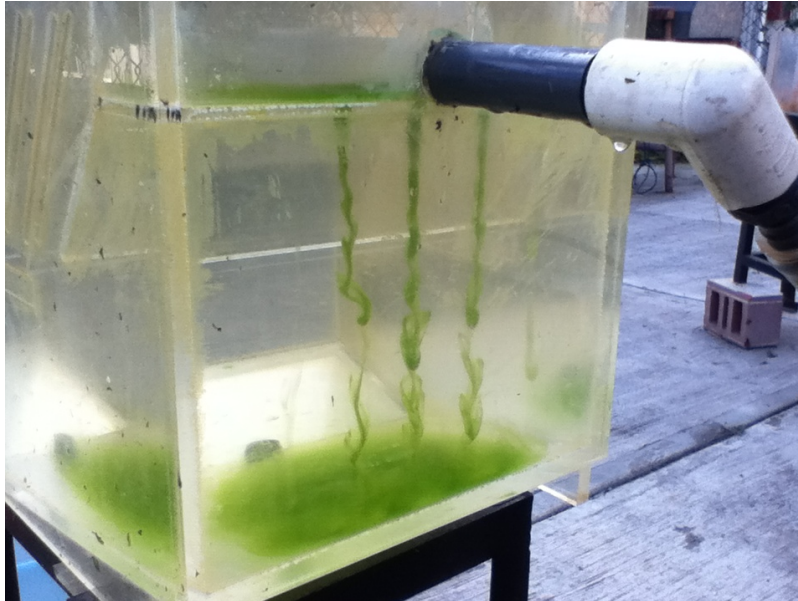
De acuerdo con los resultados anteriores (diminución de la concentración a la entrada del sedimentador, porcentaje de concentración) el porcentaje de remoción o eficiencia de separación del sedimentador disminuye. Se encuentra entre 50 y 75%. Se calculó como:

$$\%Remoción \text{ o } \eta = 1 - \frac{C_{i,agua \text{ residual}}}{C_{i,entrada \text{ biomasa}}}$$

Pero esta manera de calcular tiene un rodeo. En efecto, si aumentamos la concentración a la entrada del sedimentador, la eficiencia aumentará. Hay que relacionar ese valor con el valor del % de concentración de la

biomasa. También, la eficiencia de un proceso se puede comparar a otro proceso con el tiempo necesario para realizar esa operación y pues de sus productividades.

#### 6.3.6. *Recomendaciones y propuestas de diseño para la operación del sedimentador*



*Figura 26 – Entrada del sedimentador de placa usado para los experimentos*

En este caso vemos que hay un hueco al nivel de la entrada (figura 26). Eso genera un problema en la homogeneización del flujo. En efecto, sino había pérdidas de carga, el flujo tiene que repartirse de manera proporcional. Aquí, el flujo se reparte pero no hasta los huecos en la derecha e izquierda de la entrada (faltan 2 huecos por ambos lados).

Para concluir sobre la sedimentación: es un proceso relativamente eficaz en término de remoción de la microalga (hasta 80%). el diseño del sedimentador ocupa un lugar importante: es necesario realizar un diseño que evite la acumulación de la microalga al fondo del sedimentador en el fin de evitar de tener que parar el sedimentador para recuperar la microalga. Como ya hemos visto se requiere un mayor conocimiento sobre la microalga ya que según las condiciones del cultivo y la edad de la microalga afectan la velocidad de sedimentación de esa misma cuya afecta directamente la eficiencia de separación del sedimentador. También puede ser interesante el estudio de los pulsos de pH en el fin de favorecer la sedimentación. El agua residual se podría reusar para alimentar otro cultivo. De los otros problemas encontrados durante los experimentos son: la acumulación del oxígeno producido por la biomasa tapaba las tubería, en peculiar la salida del concentrado del sedimentador tenía ese problema ya que el flujo estaba muy bajo y la salida de un diámetro pequeño. Esos problemas se pueden resolver de manera simple usando mangueras oscuras para no dejar pasar la luz y envolver el sedimentador o construirlo con materiales no transparentes (ver también Anexo 4).



## 6.4 Acumulación de lípidos

En ciertas condiciones, la microalga se adapta y cambia su metabolismo. Así, la ausencia de nitratos, llamado en limitación por nitrógeno, favorece la acumulación de lípidos (hasta un 30% de su peso en forma de lípidos). Pero es difícil de operar en continuo porque sin nitratos la microalga no se reproduce, solo acumula lípidos y acaba por morir. Si al mismo tiempo que el cultivo está en limitación se le añade un estrés adicional bajando el pH se ha observado ([48]) que la microalga acumula hasta un 40-45% de su masa en lípidos. Este efecto es muy interesante porque es de interés obtener un alto contenido de lípidos para la producción de biodiesel. Además esa microalga tiene un rango de resistencia a la intemperie elevado (alto rango de temperatura, rango importante de utilización de la luz) que hace de ella un candidato ideal para la producción de lípidos.

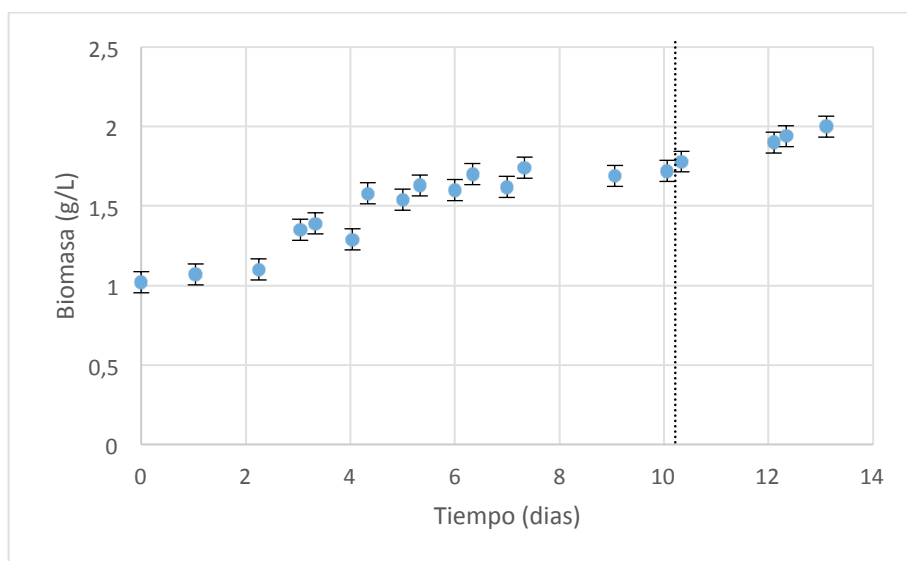
### 6.4.1. Acumulación de lípidos con limitación de nitrógeno con pulso de pH

Se realizaron experimentos en el FBR en lote y a la intemperie para comprobar esa hipótesis. El objetivo de esos experimentos fue comprobar las observaciones en otros experimentos realizados a escala del laboratorio, donde se observó que a un pH de 5.5 se encuentra el máximo de actividad fotosintética bajo condiciones de limitación de nitrógeno ([48]) y determinar el momento en el cual debe realizarse la disminución del pH. Igualmente la idea es intentar de pasar en continuo con un pH=5,5 y suficiente nitratos para que se reproduzca la microalga.



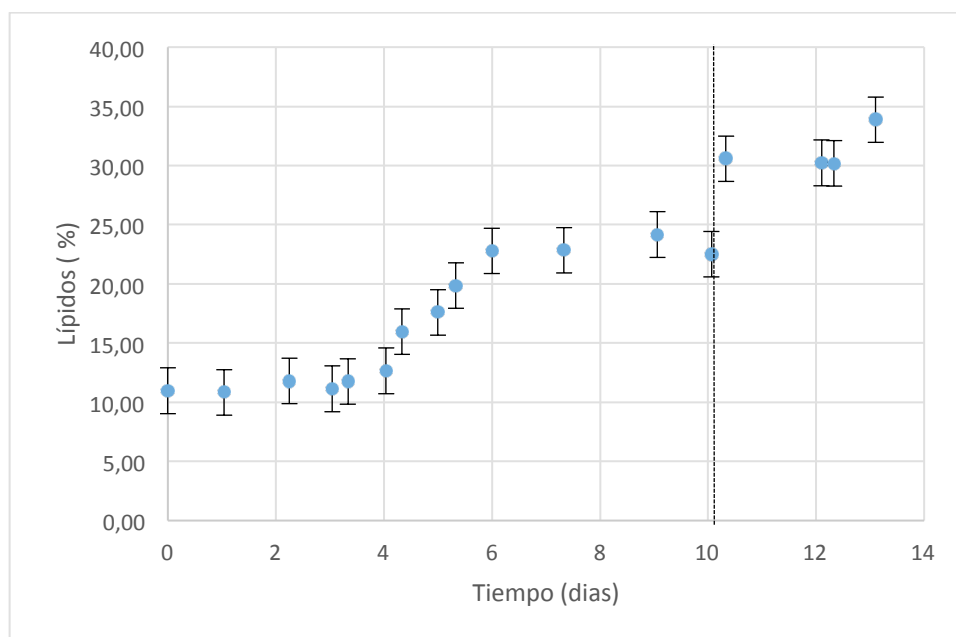
*Figura 27 – Sistema de cultivo en acumulación en lote en FBR a la intemperie con adquisición en línea del oxígeno, de la temperatura y del pH al inicio (derecha, día 3) y al final (izquierda, día 12)*





*Figura 28 - Evolución del concentración de la biomasa en el cultivo en lote y limitación con pulso de pH=5,5 al día 10*

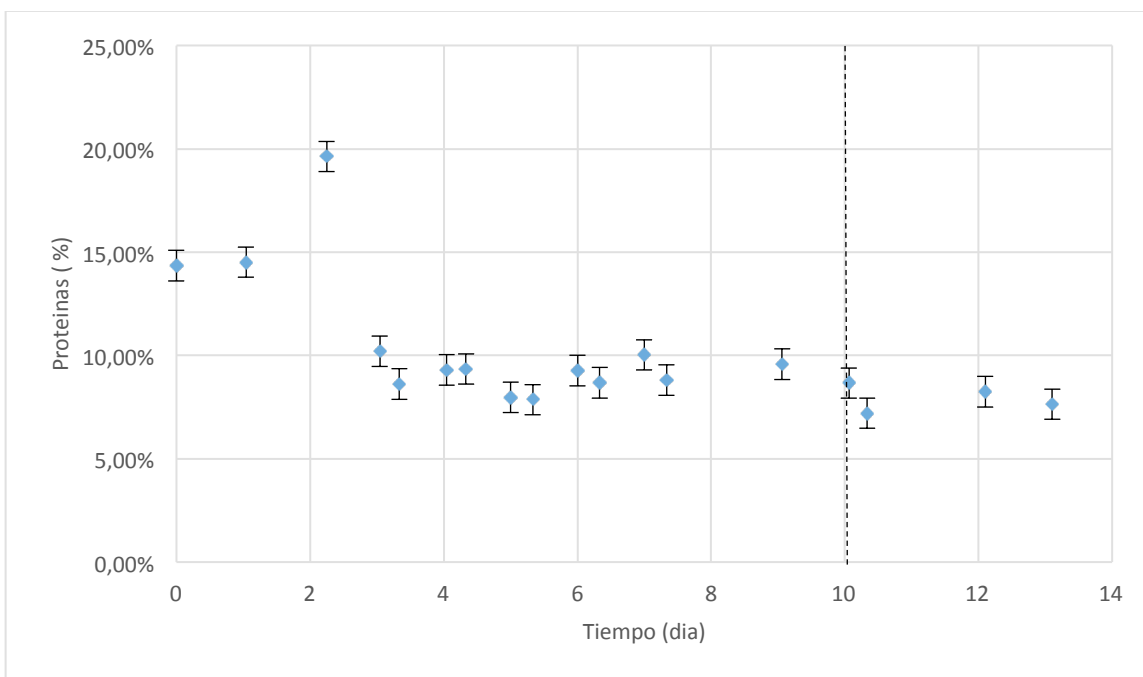
Debido a las condiciones climáticas (muy nublado al inicio del cultivo) el cultivo tardó en empezar a crecer. Se puede considerar el inicio real del cultivo fue a partir del tercer día. El cultivo inició con una concentración en biomasa de 1g/L. Se observa un aumento en la concentración de la biomasa debido a la acumulación de lípidos. A partir del día 7-8, se empezó a estabilizar alrededor de 1.65 g/L. Se observó durante esta etapa de 10 días que también que de un día a otro disminuye la concentración: durante la noche la microalga consume una parte de sus lipidos y en consecuencia el peso de la biomasa disminuye.. En el día 10 se realizó el pulso para bajar el pH del medio a 5.5. Se observó que la concentración de biomasa aumenta nuevamente hasta alcanzar casi 2 g/L.



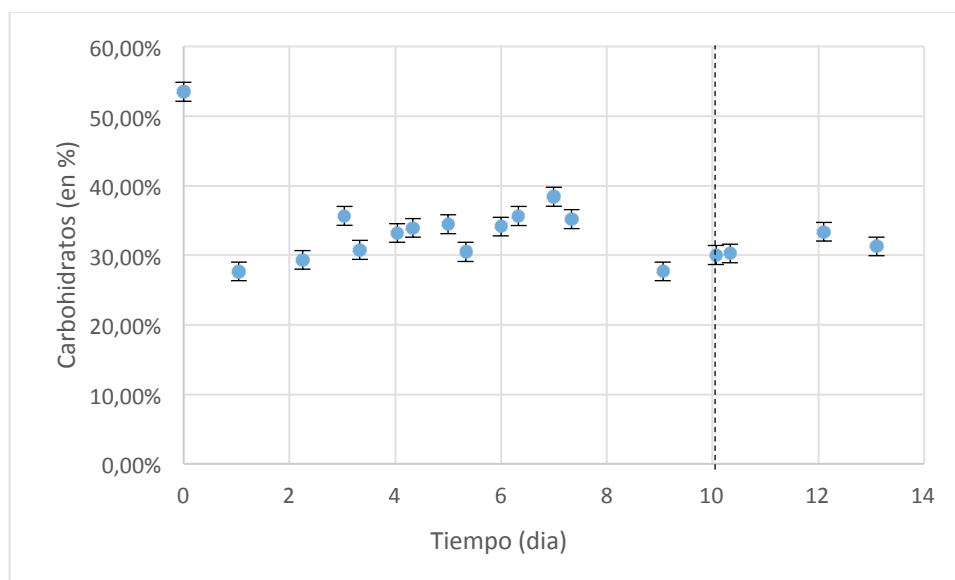
*Figura 29 - Evolución del contenido en lípidos de la biomasa en el cultivo en lote y limitación con pulso de pH=5,5 al día 10, medido por fluorometría con rojo de nilo*

Se observa de acuerdo a la evolución de la concentración de la biomasa, una fase de aumento de los lípidos debido a la ausencia inicial en el contenido de nitratos hasta alcanzar un 25%. Y el pulso de pH provocó un estrés e hizo acumular más lípidos a la microalga hasta casi un 35%.

Este primer experimento comprobó las observaciones hechas en trabajos previos.



*Figura 30 - Evolución del contenido en proteínas de la biomasa en el cultivo en lote y limitación con pulso de pH=5,5 al día 10*

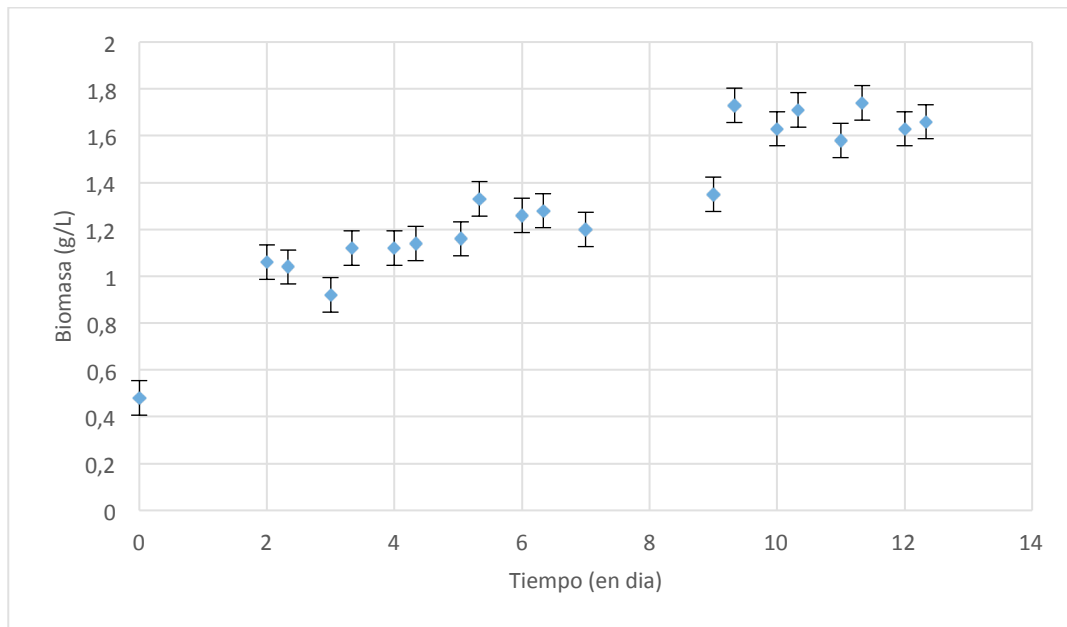


*Figura 31 - Evolución del contenido en proteínas de la biomasa en el cultivo en lote y limitación con pulso de pH=5,5 al día 10*

En condiciones de limitación, la microalga acumula lípidos y en contrapartida consume sus proteínas como fuente de nitrógeno y los carbohidratos como fuente de energía directa. De hecho, el contenido en proteínas disminuye y de los carbohidratos se mantiene relativamente constante (la disminución es muy leve).

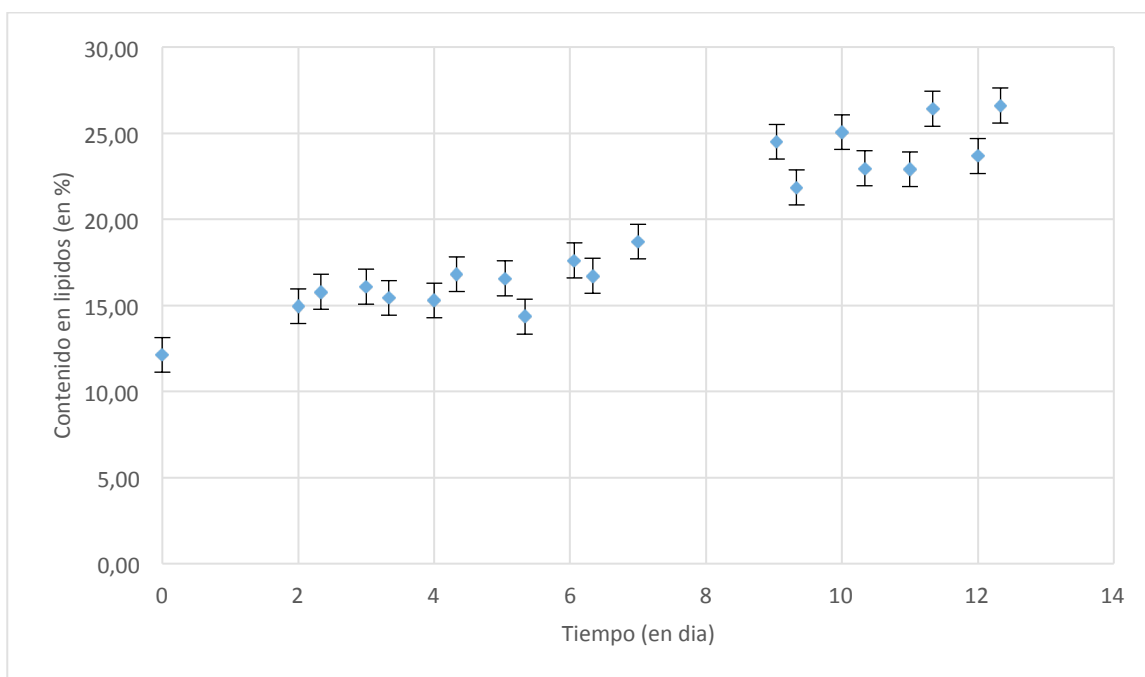
Se hizo un experimento bajo condiciones de acumulación de lípidos con pH=5,5 desde el inicio de la operación del sistema y la grafica se presenta a continuación

#### 6.4.2. Acumulación de lípidos con limitación de nitrógeno y pH=5,5



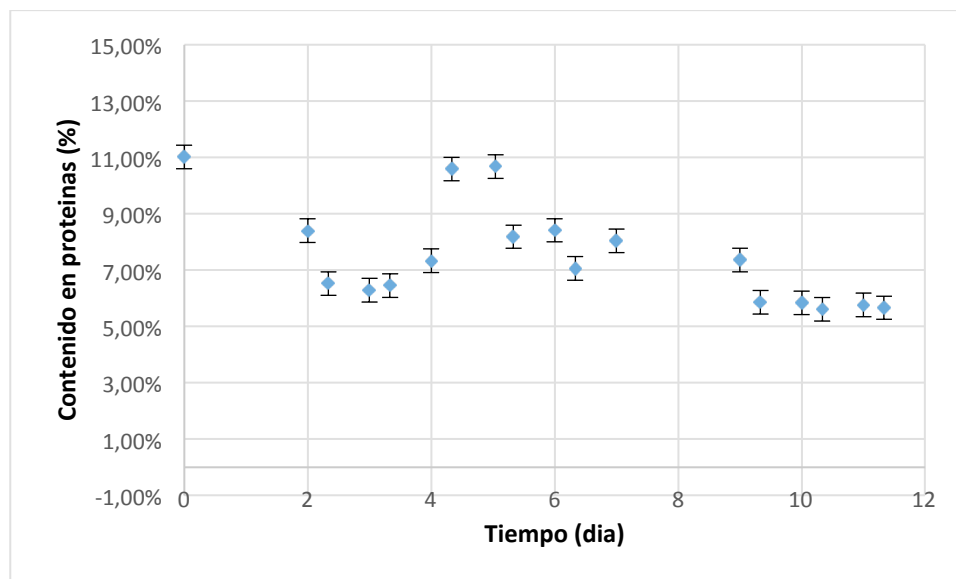
*Figura 32 - Evolución de la concentración de la biomasa en el cultivo en lote y limitación a pH=5,5*

En un segundo experimentos, se pudo observar que globalmente, la concentración en biomasa aumenta: en un factor de 3.5 veces.

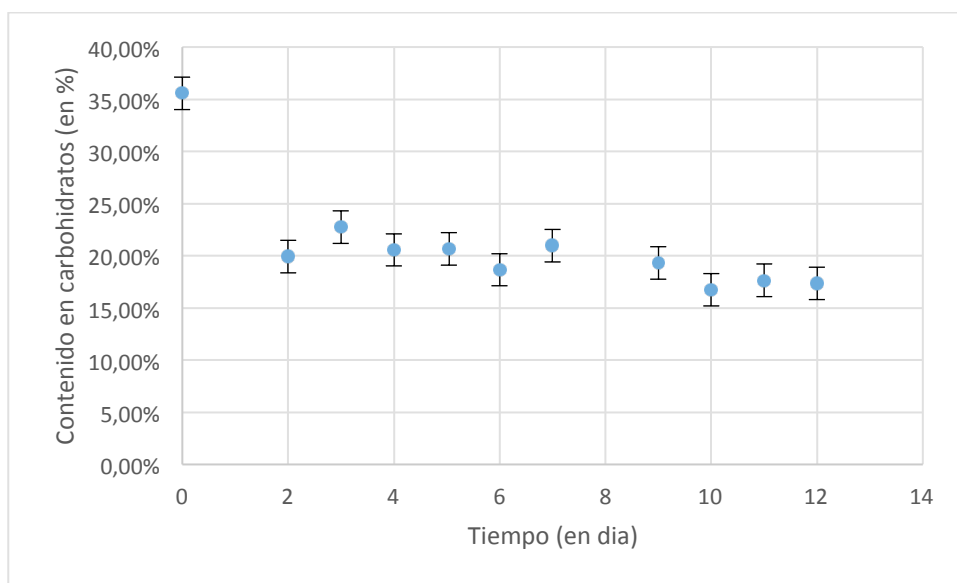


*Figura 33 - Evolución del contenido en lípidos de la biomasa en el cultivo en lote y limitación a pH=5,5*

También, los lípidos aumentaron pasando de 12,3% a 26,6%. Pero ese aumento no corresponde a lo que se observó anteriormente (REFERENCIA). Lo cual puede deberse a cantidad de luz que llegó al sistema y la concentración (cual afecta también la disponibilidad de la luz).



*Figura 34 - Evolución del contenido en proteínas de la biomasa en el cultivo en lote y limitación a pH=5,5*



*Figura 35 - Evolución del contenido en carbohidratos de la biomasa en el cultivo en lote y limitación a pH=5,5*

De manera similar al experimento precedente, las proteínas y los carbohidratos tienen como tendencia de disminuir a lo largo del tiempo.

En conclusión, al parecer, el experimento de acumulación con pulso sería más eficiente. Pero es difícil de sacar una conclusión cierta. Habría que realizar otros experimentos en limitación a la intemperie con pulso y con pH=5,5 desde el inicio para varias concentraciones.

## 6.5 Balance de energía

Se realizó un balance de energía considerando las diferentes etapas del procesos de cultivo con el fin identificar las operaciones/puestos de mayor consumo de energía del cultivo continuo en FBR para reducir el consumo de energía y en consecuencia reducir el precio de producción. El balance de energía se realizó mediante el software “Engineering Equation Solver” cual permite plantear ecuaciones y emplear tablas termodinámicas de varios compuestos, y el uso de funciones matemáticas. Se puede también realizar estudios paramétricos: realizar cálculos para varias valores de una o varias variables. En este software se pudieron obtener las tablas siguientes. Además, en el anexo XX se encuentra también el programa planteado en el software (ecuaciones, valores, tablas paramétricas) que fueron evaluadas con los parametros obtenidos en ciertas condiciones.

La simulación se realizó a partir de los datos reales de los cultivos excepto para el raceway continuo cual fue simulado con los datos del raceway en lote (misma concentración, velocidad de crecimiento de la microalga correspondiendo a la concentración). En la simulación solo se usaron los datos de los sistemas de cosecha de la UAM.

	Producción (kg)	Días de cultivo	Concentración (g/L)	Productividad (kg/día)
RW batch	0.120	18	0.80	0.007
<b>RW Continuo</b>	<b>1.199</b>	<b>18</b>	<b>0.80</b>	<b>0.067</b>
FBR Batch	0.083	16	3.45	0.005
FBR Continuo	0.086	10	1.0	0.009
Ref	443.7	333	0.70	1.332

	Volumen cultivo (L)	Productividad con respecto al volumen (kg/dia.L)
RW batch	150	0.0000444
<b>RW Continuo</b>	<b>150</b>	<b>0.0004441</b>
FBR Batch	24	0.0002156
FBR Continuo	24	0.0003569
[41]	52750	0.0000253

*Tabla 18 – Datos de los cultivos*

La tabla 18 reagrupa los datos de cosecha de los diferentes sistemas y de la referencia [41]. Observamos que a pesar de tener una alta producción, la referencia tiene la productividad por volumen la menor.

[41] cuenta con un sedimentador y filtración para la realización del cultivo.

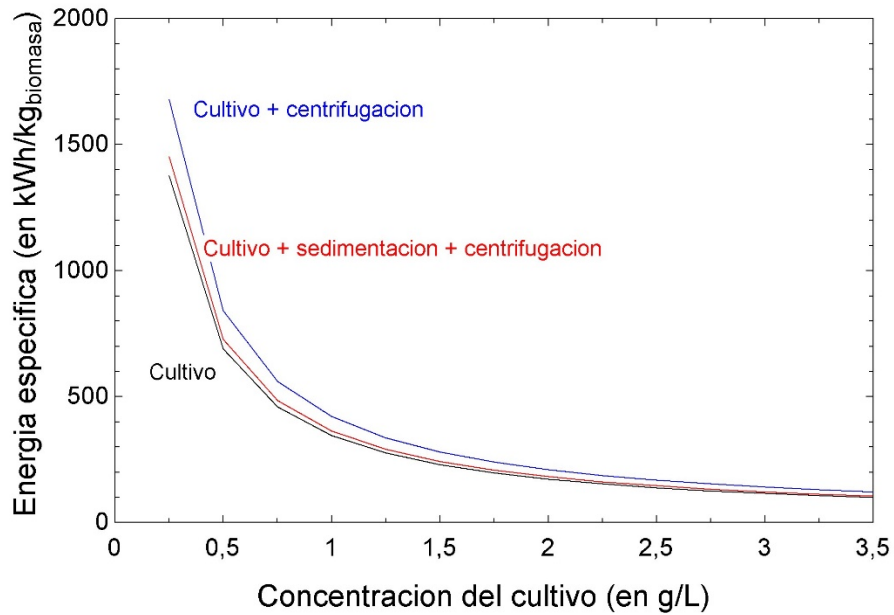
	Energía Especifica Consumida (kWh/kg <sub>biomasa</sub> )	Coste de energia en Francia (€/kg <sub>biomasa</sub> )	Coste de energia en EE.UU (\$/kg <sub>biomasa</sub> )	Coste de energia en México (MXN/kg <sub>biomasa</sub> )
RW batch	1356	189.84	162.72	1084.8
RW Continuo	157	21.98	18.840	125.6
FBR Batch	575.2	80.528	69.024	460.16
FBR Continuo	363.1	50.834	43.572	290.48
Ref	4.51	0.632	0.542	3.61

	Coste de energía en México (€/kg <sub>biomasa</sub> )	Coste de energía en México (\$/kg <sub>biomasa</sub> )
<b>RW batch</b>	64.958	70.442
<b>RW Continuo</b>	7.521	8.156
<b>FBR Batch</b>	27.554	29.881
<b>FBR Continuo</b>	17.394	18.862
<b>[41]</b>	0.216	0.234

*Tabla 19 – Consumo específico de los sistemas y costo de energía asociados a los diferentes sistemas de producción en Francia, en EE.UU y en México (tabla de conversión de las monedas en el Anexo 6)*

La tabla 19 presenta el consumo específico de los sistemas de cultivo y el costo asociado al consumo de energía por país en su moneda y el costo en México en euro y en dólares. Se observa que [41] tiene el coste más bajo de producción. De los 3 cultivos que se realizan en la UAM, al parecer el raceway continuo es el más económico y luego el FBR continuo. Pero en realidad el raceway continuo es solo en esa simulación que sale así y ya se sabe que ese sistema de cultivo no es tan rentable. Es probablemente un rodeo en los valores usados ya que no son basados en experimentos. El raceway en batch es el sistema más caro y con una productividad baja (tabla 19 precedente). Esas diferencias con [41] es debido principalmente a la escala de producción ya que lo llevan a nivel industrial cuyos equipos están diseñados para una producción a gran escala con coste menor que los equipos de laboratorio que fueron usados para realizar los experimentos. Esos últimos no necesariamente buscan ser eficientes al nivel energético sino más bien ser el más eficiente al nivel de su función. Entonces, según [41] se podría bajar el coste energético de cultivo a 4,5 kWh o menos. Pero, mientras que el coste sea muy bajo en la referencia, la productividad con respecto al tiempo y el volumen sale totalmente diferente. Los cultivos en FBR-CB son 10 veces más productivos que el raceway o [41].

A continuación, se presentan las curvas de consumo energético específico del cultivo continuo en FBR-CB (figura 36).

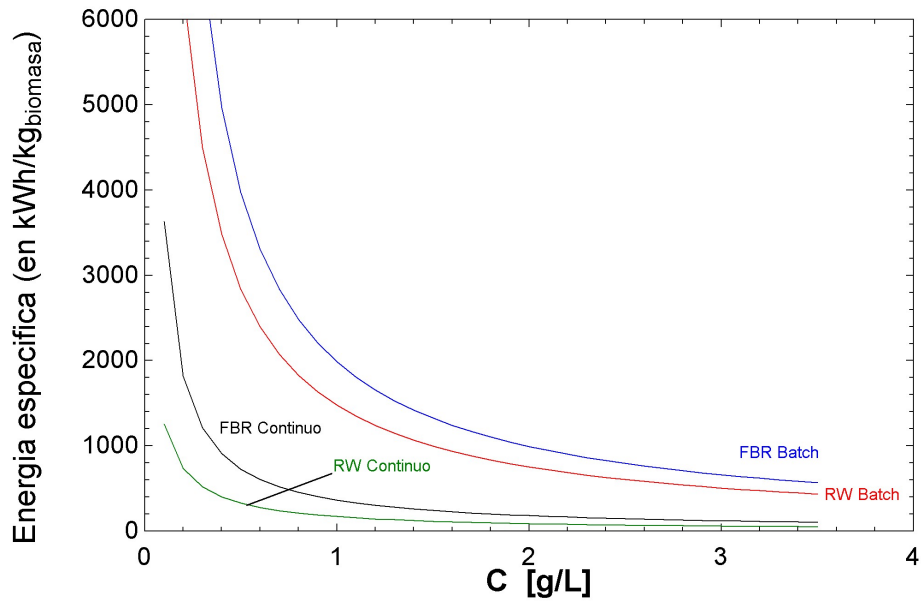


*Figura 36 – Consumo específico del FBR continuo para el cultivo únicamente (curva negra), con la centrifugación y con la centrifugación precedido por la sedimentación*

Obviamente, el cultivo en continuo combinado a la sedimentación es el más interesante en consumo de energía. Este justifica la importancia de la pre concentración de la biomasa antes de su recuperación para bajar drásticamente su costo ya que el cultivo seguido con sedimentación casi tiene el mismo coste energético que el cultivo en continuo solo.

Luego (figura 37), se presenta las curvas de consumo energético específico de los 2 sistemas de la UAM: Raceway en lote (valores basado en el experimento) y en continuo (valores de simulación), FBR-CB en batch y FBR-CB en continuo (incluye sedimentación y centrifugación en el consumo energético de los procesos).





*Figura 37 – Consumo específico de los dos sistemas de la UAM (FBR y RW) para ambos modo (batch o continuo) con centrifugación precedido de la sedimentación*

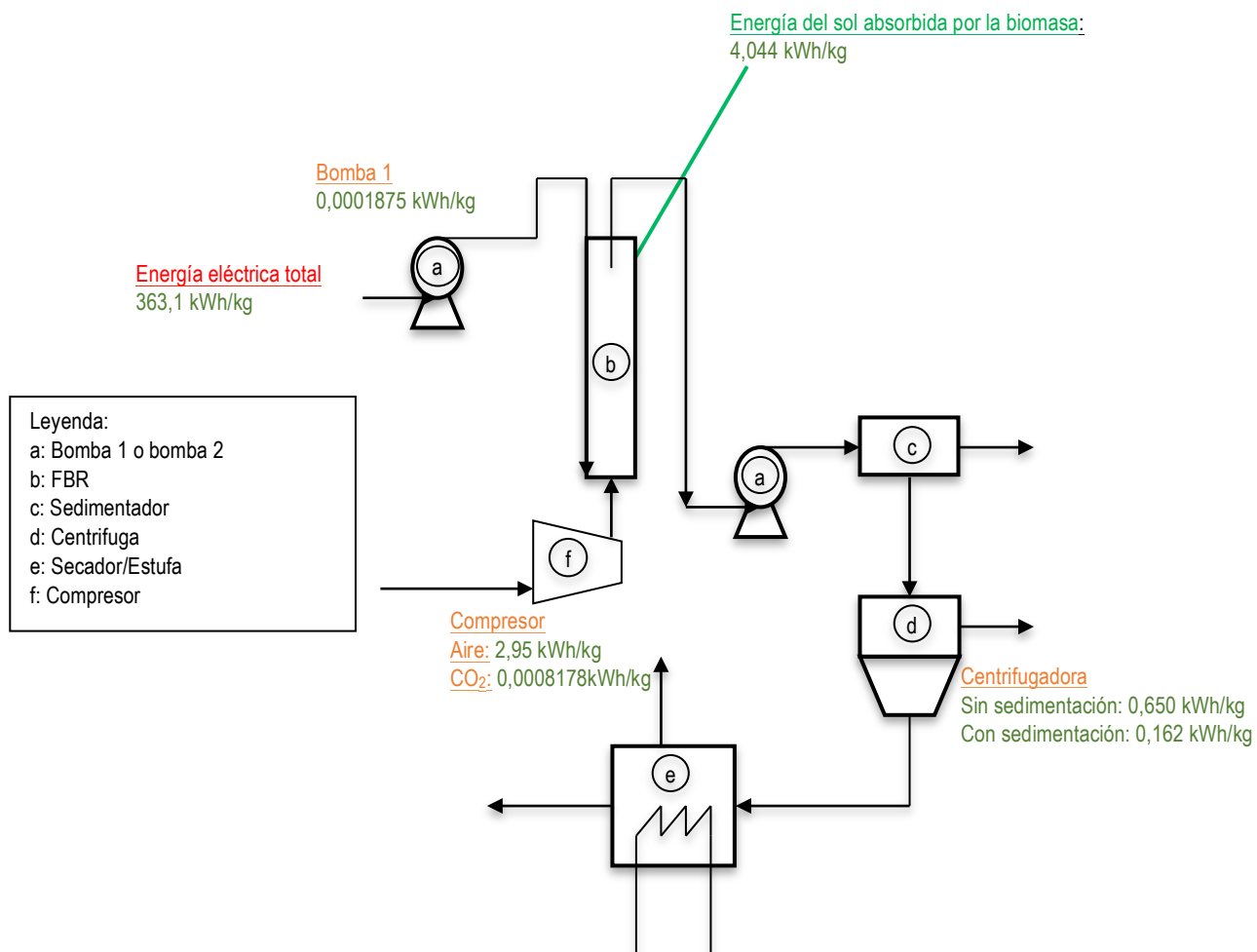
Como se dijo anteriormente, el cultivo FBR en batch tiene el mayor consumo energético. El consumo específico aumenta de manera exponencial cuando disminuye la concentración. Si en continuo nos ponemos a 2g/L, nos acercamos del coste del RW a 1 g/L porque es difícil de tener una concentración mayor a 1-1.5 g/L en RW.

	Consumo bomba 1 (kWh/día)	Consumo Bomba 2 (kWh/día)	Consumo Compresor Aire (kWh/día)	Consumo Compresor CO <sub>2</sub> (kWh/día)
RW batch	0	0	0	0
RW Continuo	0.0001875	0.0001875	0	0
FBR Batch	0	0	2.95	0.0008178
FBR Continuo	0.0001875	0	2.95	0.0008178
Ref				
	Consumo motor mezcla (RW, kWh/día)	Consumo Centrifuga (kWh/día)	Consumo sedimentación + centrifuga (kWh/día)	
RW batch	8.88	11.38	2.84	
RW Continuo	8.88	6.31	1.58	
FBR Batch	0	1.82	0.455	
FBR Continuo	0	0.650	0.162	
[43]		0.0271		
	Total sin sedimentación (kWh/día)	Total con sedimentación (kWh/día)		
RW batch	20.26	11.72		
RW Continuo	15.19	10.46		
FBR Batch	4.8	3.4		
FBR Continuo	3.60	3.11		
[43]	0.027			

*Tabla 20 – Consumo específico por equipo para los sistemas en modo batch y continuo sin y con sedimentación antes de la centrifugación*

El valor de [43] es para un flujo de 0,94 mL/min y una eficiencia de 94% y con un consumo de 20 kWh/m<sup>3</sup>. Podemos ver que el cultivo en el FBR permite reducir el consumo de energía. Pero como ya hemos visto, el consumo específico para la biomasa (tabla 20) es mayor para esos sistemas que lo del RW continuo.

Entonces, la concentración en el FBR es un punto importante ya que se puede obtener fácilmente concentraciones mayor a las que fueron usados en la simulación y mayor al RW en continuo. Eso permitiría realizar ahorros de energía en la producción en FBR y en consecuencia un coste menor de producción de la biomasa. También es importante de notar que el RW puede difícilmente tener concentraciones mayores a 1,5 g/L. Usando centrifugadoras para operación en continuo, [43] alcanza un consumo diario muy bajo. El estudio [43] demuestra que aumentando el flujo a la centrifugadora permite reducir el coste energético pero también la eficiencia. [43] nos enseña que existe un valor de flujo (alrededor de 23L/min) y de eficiencia de separación (alrededor de 30%) por lo cual el proceso es el más económico y permite de bajar el precio del aceite a 0,864\$/L<sub>aceite</sub>.



*Esquema 8 – Modelo de consumación específica del cultivo FBR continuo (solamente el cultivo y el sedimentador operan en continuo)*

El esquema 8 presenta la repartición de la consumo de los equipos. La segunda bomba no aparece porque técnicamente no consume energía y sirve solo a regular el flujo (sistema de sifón con diferencia de

presión y de niveles para sacar el cultivo). Como faltan datos sobre la microalga (su calor específico real  $C_p$  entre otro) no se pudo calcular la energía requerida/consumida por el secador. Constatamos que el solo proceso de cultivo y recuperación de la biomasa consume mucha energía en comparación a lo que acumula la biomasa del sol. Probablemente el compresor está sobredimensionado ya que se usó un compresor industrial cual suministra aire a 5,5 bar y la columna no tiene tanta presión a vencer (0.9 bar aproximadamente). Las bombas tienen un consumo despreciable a frente de los demás equipos y con relación a lo que absorbe la biomasa. La sedimentación permite de reducir de un factor 4 el consumo de la centrifugadora. Según [43], usando una centrifuga industrial para procesos continuo se podrá disminuir el drásticamente el costo de centrifugación (en un factor 5 veces menor) y en consecuencia el coste total de cultivo y recuperación.

## 7. Conclusión y perspectivas

La caracterización del cultivo en continuo permite confirmar la factibilidad de una tal proceso para las microalgas en fotobioreactor. Lograr un proceso continuo para la microalga permite de reducir drásticamente el consumo específico en energía de la biomasa. Usando equipos adaptados (bombas, compresor) se podrá disminuir el coste de cultivo.

Los procesos de pre-concentración presentan un gran interés porque permiten reducir el coste de recuperación de la biomasa. En particular la sedimentación es un paso importante ya que no consume energía y permite de reducir por mucho el costo de producción de la biomasa. El trabajo realizado nos enseña la importancia de estudiar la sedimentación: la microalga por ser un ser vivo se adapta a su medio y a los cambios de las condiciones externas y su velocidad de sedimentación. Una configuración de sedimentador sencilla con placas nos permite lograr factores de ahorro de energía interesante. Las posibles mejoras del sedimentador son en primer lugar la salida de la biomasa que debe evitar su acumulación al fondo del sedimentador. Se podría combinar al sedimentador una cámara de mezcla con pulso de pH o combinar la sedimentación a otros tipos de procesos de separación tal como la electro-floculación o podemos imaginar la combinación de un proceso de electrolisis y un sedimentador para recuperar directamente los lípidos.

El estudio de la acumulación de lípidos a la intemperie nos permite de constatar la dificultad de la simulación para la acumulación. Con el fin de producir biodiesel, la acumulación de los lípidos es un punto importante. Ahora, queda a llevar los experimentos al paso siguiente: pasar a un cultivo continuo en acumulación.

De una parte hemos visto a través de ese trabajo que el cultivo y la recuperación de la biomasa son procesos que consumen mucha energía. La combinación de varios métodos (sedimentación, centrifugación con flujos altos) permite de reducir el consumo de energía y en consecuencia el coste de producción. Con esos mejoramientos, la producción de microalga y de los lípidos se acerca del coste de producción del petróleo.

De otra parte, la simulación en EES puede ser llevada a algo más completo en el fin de estudiar varias condiciones y encontrar el punto económico óptimo de consumo de energía y de producción de biomasa. El desarrollo poco a poco de modelos de consumo por medio de un software va a permitir de establecer un modelo cada vez más complejo, tomando en cuenta cada más parámetros tantos del medio ambiente que del metabolismo de la microalga.

## 8. REFERENCIAS

- [1] Richmond A. (2004). Photosynthesis in microalgae, In: Handbook of microalgal culture. Richmond A. *CPR Press*, pp 20-40.
- [2] Hall DO, Rao KK. (1999) Photosynthesis, 6th edition, Cambridge University Press, U.K. *Plant Physiol.* 144: 54-59.
- [3] Singer SJ, Nicholson GL. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731.
- [4] Sánchez-Mirón A, Camacho FG, Gomez AC, Molina GE, Chisti Y. (1999) Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *J Biotechnol.* 70: 249–270.
- [5] Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.
- [6] Masojídek J, Koblíček M, Torzillo G. (2004) Photosynthesis in Microalgae. In: Handbook of Microalgal Culture: *Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond A (Ed.). Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. 20–39.
- [7] Wang B, Li Y, Wu N, Lan Q. (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 79: 707-718.
- [8] Lara MA, Moreno JL, Amaro EJ. (1996). Fitoplancton: Conceptos básicos y técnicas de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.
- [9] Borowitzka MA (1988). Vitamins and fine Chemicals from MicroAlgae, in Micro-Algal Biotechnology, Borowitzka, M.A. & Borowitzka (1988), L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge, pp: 153-196.
- [10] Donohoe J, Cogdell JR. (2006). Microorganisms and clean energy. *Nat Rev. Microbiol.* 4: 800-805.
- [11] Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussgnug JH, Posten C, Kruse O, Hankamer B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1: 20-43.
- [12] Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy.* 34:1-5.
- [13] Rodolfi L, Chini-Zitelli G, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 100-112.
- [14] Wilkie, A. C., Edmundson, S. J., & Duncan, J. G. (2011). Indigenous algae for local bioresource production: phycoprospecting. *Energy for sustainable development*, 15(4), 365-371.
- [15] Borowitzka M A, Hallegraeff G. (2007). Economic Importance of Algae, In: Algae of Australia. *Australian Bio Resources.* 594-622.
- [16] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006). Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 87-96.

- [17] Becker EW. (1994). Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- [18] Chaumont D. (1993) Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *J Appl Phycol.* 5: 593-604.
- [19] Chisti, Y. (2006) Microalgae as sustainable cell factories. *Environ Eng Manag J.* 5: 261-271.
- [20] Pulz O. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57: 287-293.
- [21] Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
- [22] Molina EM, Acién FG, Cmacho FG, Rubio FC, Chisti Y. (2000). Scale –up of tubular photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 12: 355-368.
- [23] Arredondo BO, Vázquez-Duhalt R. (1991). Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo.* 17: 99-111.
- [24] Richmond A. (1986). Cell response to environmental factors, In: Handbook of microalgal mass culture. Richmond A. *CPR Press*, pp 69-116.
- [25] Molina Grima E, Fernández J, Acién Fernández FG, Chisti Y. (2001) Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J Biotechnol.* 92: 113-131.
- [27] Torzillo G, Accolla P, Pinzani E, Masojidek, J. (1996) In situ monitoring of chlorophyll fluorescence to assess the synergistic effect of low temperature and high irradiance stresses in *Spirulina* cultures grown outdoors in photobioreactors. *J Appl Phycol.* 8: 283-291.
- [28] Vonshak A, Torzillo G, Masojidek J, Boussiba, S. (2001) Sub-optimal morning temperature induces photoinhibition in dense outdoor cultures of the alga *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta). *Plant Cell Environ*, 24: 1113-1118.
- [29] Darzins A, Pienkos P, Edye L. (2010). Current Status and Potential for Algal Biofuels Production. A REPORT TO IEA BIOENERGY TASK 39.
- [30] Tredici M. R. (2010). Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tlls for the next green revolution. *Biofuels.* 1: 143-162.
- [31] Luo H, Al-Dahhan MH. (2004). Analyzing and modeling of photobioreactors by combining first principles of physiology and hydrodynamics. *Biotechnol. Bioeng.* 85: 382-393.
- [32] Janssen M, Slenders P, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. (2001). Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 298-305.
- [33] Wu X, Merchuk JC. (2001). A model integrating fluid dynamics in photosynthesis and photoinhibition processes. *Chem Eng Sci.* 56:3527–3538.
- [34] Nedbal L, Tichy V, Xiong F, Grobbelaar JU. (1996). Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light. *J Appl Phycol.* 8:325–333.

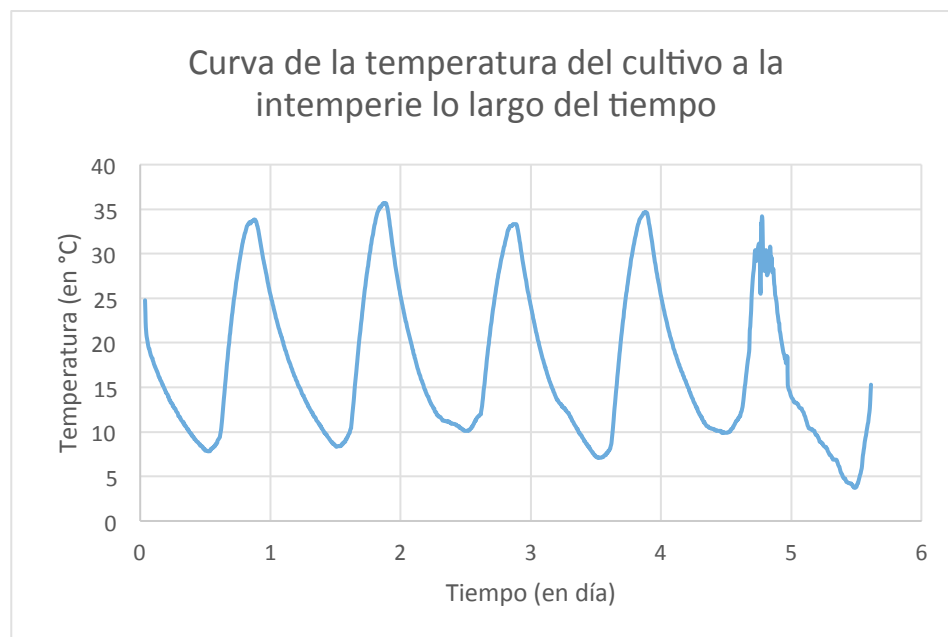
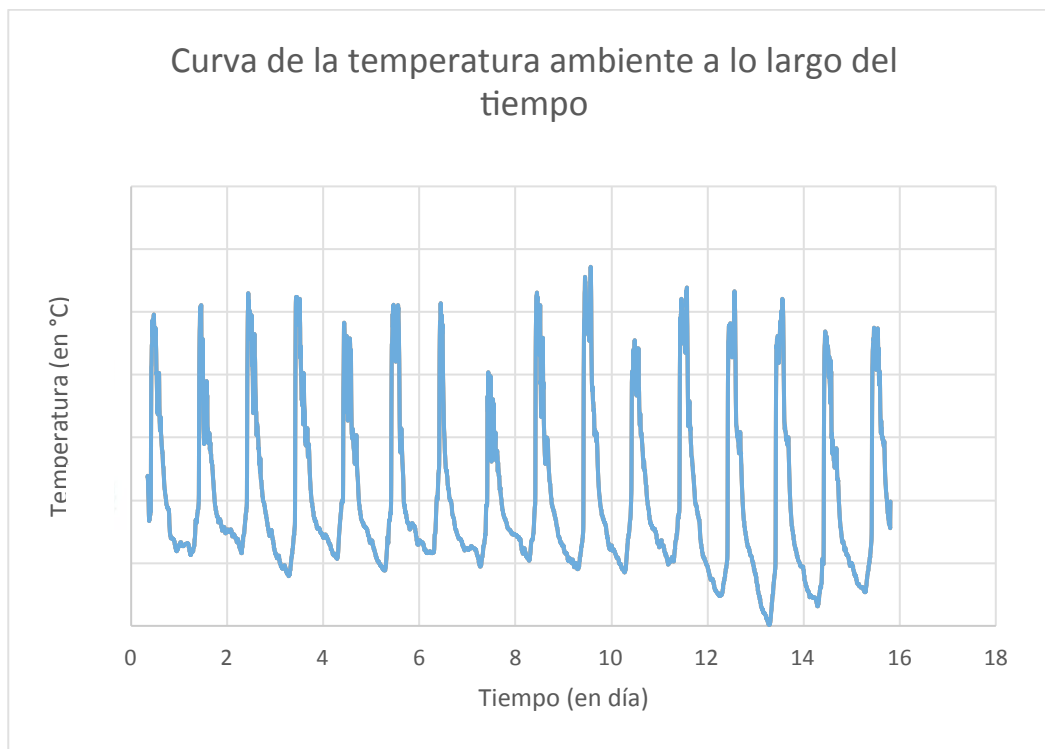
- [35] Terry KL. (1986). Photosynthesis in modulated light: Quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnol Bioeng.* 28: 988-995.
- [36] Hancke K, Hancke TB, Olsen LM, Johnsen G, Glud RN. (2008). Temperature effects on microalgal photosynthesis–light responses measured by O<sub>2</sub> production, pulse-amplitude-modulated fluorescence, and <sup>14</sup>C assimilation. *J. Phycol.* 44:501–514.
- [37] Zevenboom W, Post AF, Van Hes UM, Mur LR. (1983). A new incubator for measuring photosynthetic activity of phototrophic microorganisms, using the amperometric oxygen method. *Limnol. Oceanogr.* 28: 787-791.
- [38] Dubinsky Z, Falkowski PG, Post AF, Van-Hes UM. (1987). A system for measuring phytoplankton photosynthesis in a defined light field with an oxygen electrode. *J Plankton Res.* 9: 607-612.
- [39] Toledo-Cervantes A, Morales M, Novelo N, Revah S. (2013). Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresour. Technol.* 130: 652-658.
- [40] Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 557-577.
- [41] Nurra, C., Torras, C., Clavero, E., Rios, S., Rey, M., Lorente, E.,... & Salvado, J. (2014). Biorefinery concept in a microalgae pilot plant. Culturing, dynamic filtration and steam explosion fractionation. *Bioresource technology*, 163, 136-142.
- [42] Shelef, G., Sukenik, A., & Green, M. (1984). *Microalgae harvesting and processing: a literature review* (No. SERI/STR-231-2396). Technion Research and Development Foundation Ltd., Haifa (Israel).
- [43] Dassey, A. J., & Theegala, C. S. (2013). Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. *Bioresource technology*, 128, 241-245.
- [44] Uduman, N., Bourniquel, V., Danquah, M. K., & Hoadley, A. F. (2011). A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, 174(1), 249-257.
- [45] Cohen Z. (1986). Products from microalgae. *In: Handbook of microalgal mass culture*. Richmond A. Press, 421-454.
- [47] Garibay HA, Vázquez-Duhalt R, Sánchez SM, Serrano CL, Martínez JA (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología* 13: 38-66.
- [48] Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., & Morales, M. (2015). Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresource Technology*.
- [49] Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource technology*, 102(1), 71-81.
- [50] Ma, F., & Hanna, M. A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource technology*, 70(1), 1-15.

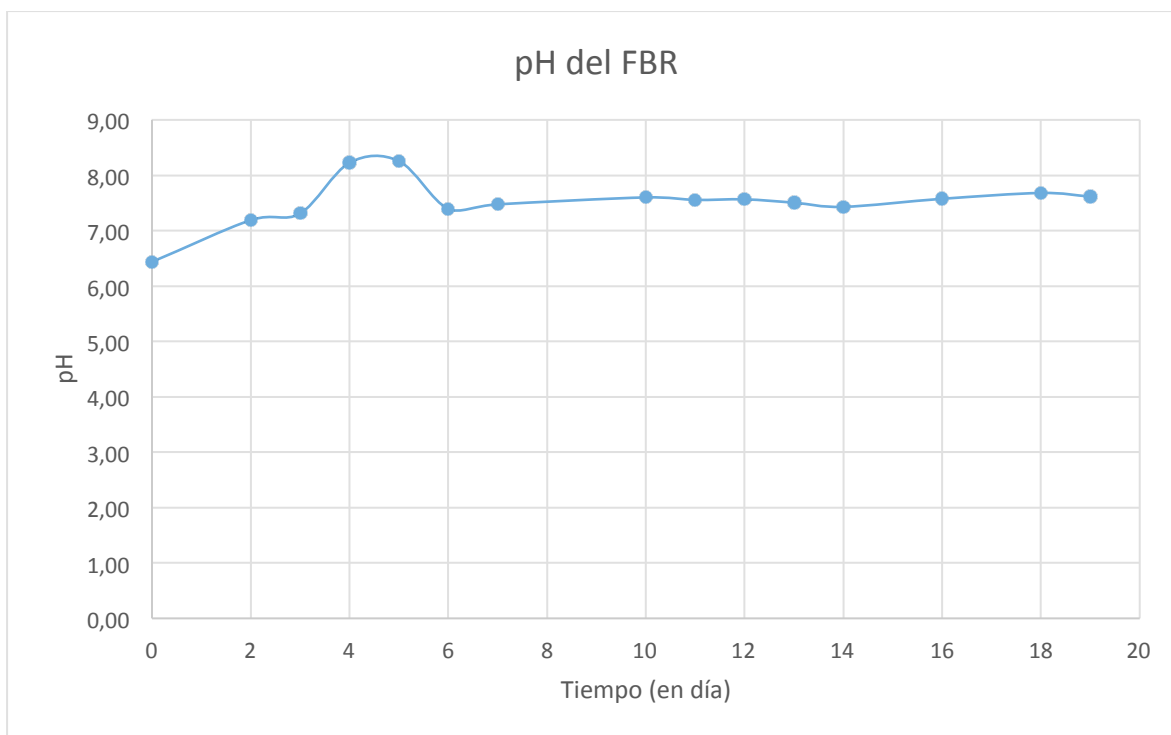
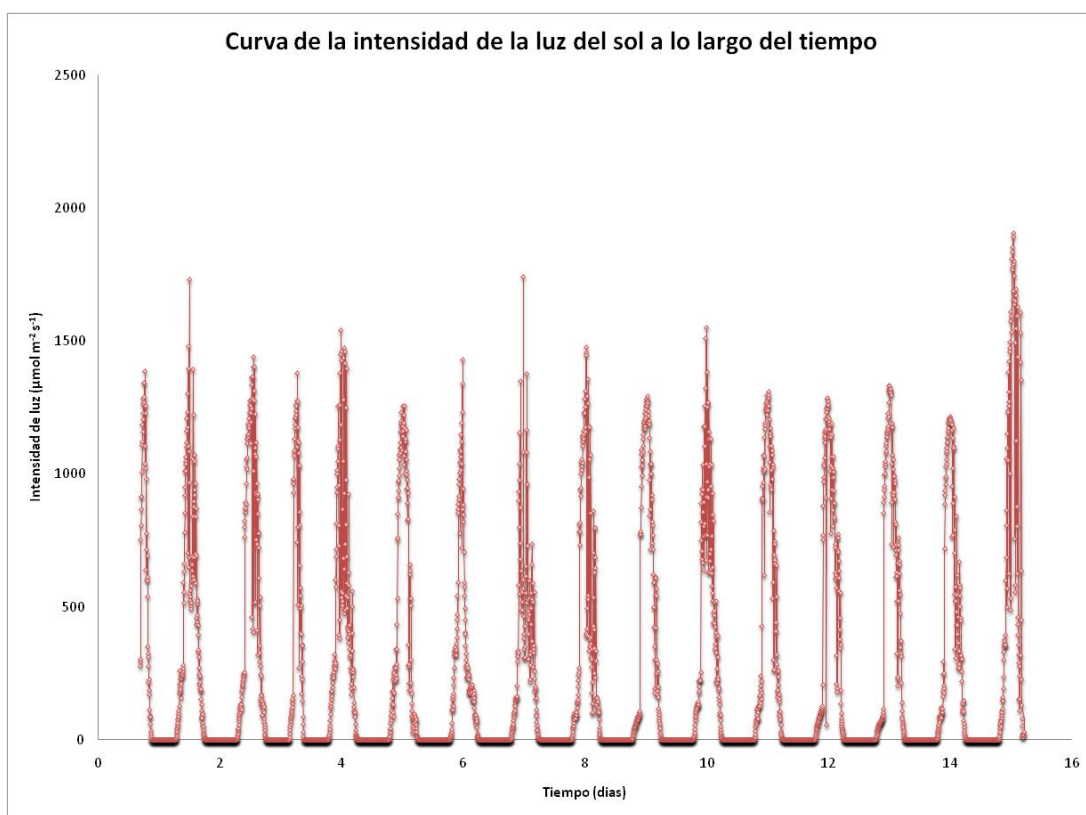


- [51] Cabello, J., Morales, M., & Revah, S. (2014). Dynamic photosynthetic response of the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* to light intensity perturbations. *Chemical Engineering Journal*, 252, 104-111.
- [52] Sánchez L. (2013) Cultivo a la intemperie de *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobiorreactor solar airlift. Tesis dirigida por la Dra. Marcia Morales en la Maestría en Biotecnología de la UAM.
- [53] Toledo-Cervantes A., Morales M., Novelo N., Revah S. (2013). Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresour. Technol.* 130, 652-658.
- [54] de Morais MG, Costa JAV. (2007). Carbon dioxide fixation by *Clorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. Cultivated in flask and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnol Lett.* 29:1349-1352.
- [55] Chen W, Sommerfeld M, Hu Q. (2011). Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresour Technol.* 102:135-41.
- [56] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- [57] Dubois M, Gilles DA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- [58] Toledo Cervantes A. L. (2010) Captura de CO<sub>2</sub> por una comunidad de microalgas obtenidas de un ecosistema natural mexicano. Tesis dirigida por la Sergio Revah Moiseev en la Maestría en Biotecnología de la UAM.
- [59] Khozin-Goldberg I. (2002). Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incise* (Trebuxiophyceae). *J. Phycol.* 38: 991-994.
- [60] Solovchenko AE, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Cohen Z, Merzlyak MN (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incise*. *J Appl Phycol.* 20: 245-251.
- [61] Khozin-Goldberg I, Cohen Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67: 696-701.
- [62] Grima, E. M., Belarbi, E. H., Fernández, F. A., Medina, A. R., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology advances*, 20(7), 491-515.
- [63] Matos, C. T., Santos, M., Nobre, B. P., & Gouveia, L. (2013). *Nannochloropsis* sp. biomass recovery by Electro-Coagulation for biodiesel and pigment production. *Bioresource technology*, 134, 219-226.
- [64] Pérez J. A., Sedimentacion, *Manual de Tratamiento de aguas*, Universidad Nacional – Facultad de Minas de Colombia

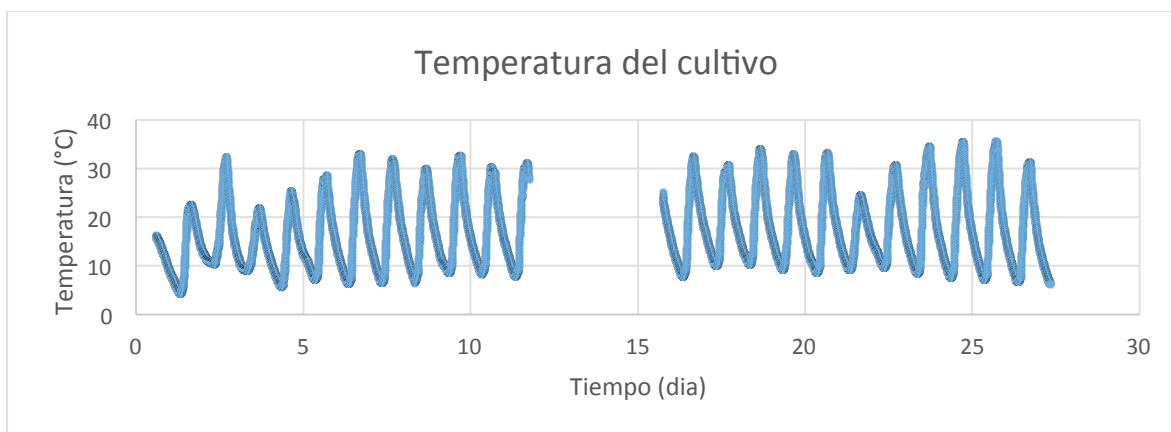
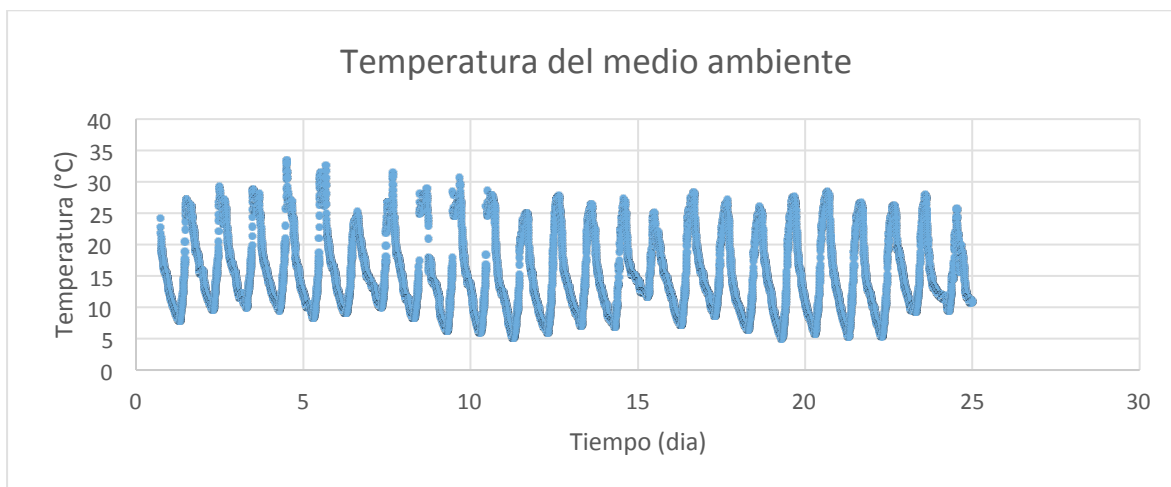
## 9. ANEXOS

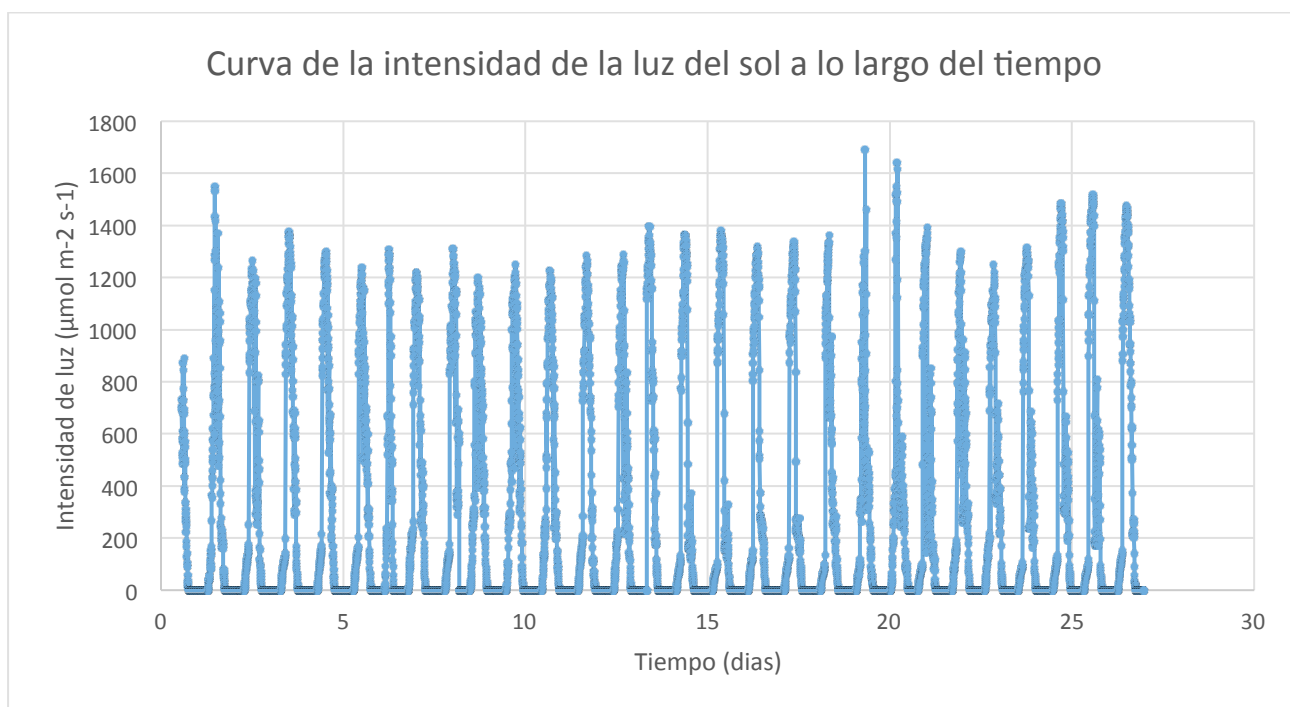
### Anexo 1 – Monitoreo del cultivo en lote de familiarización - Curvas de temperatura del ambiente, del medio, del pH del cultivo en lote y curva de intensidad de luz que llega al reactor





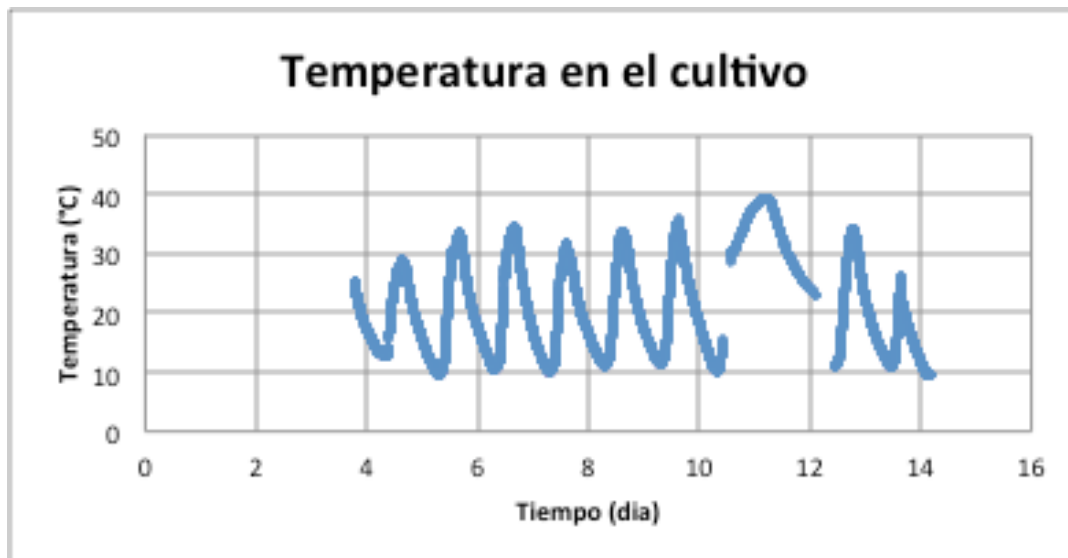
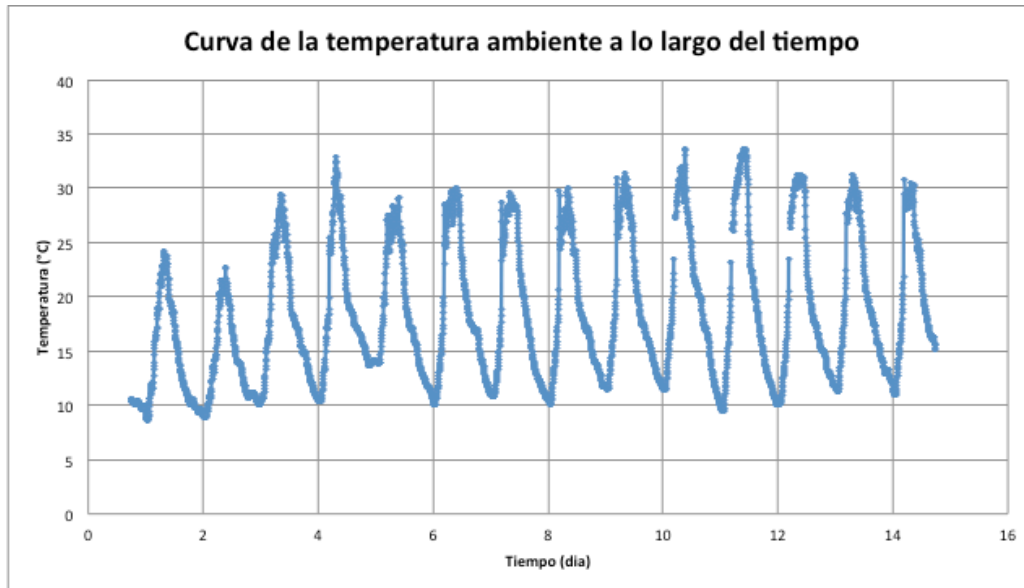
## Anexo 2 – Monitoreo del cultivo en continuo - Curvas de temperatura del ambiente, del medio y curva de intensidad de luz que llega al reactor

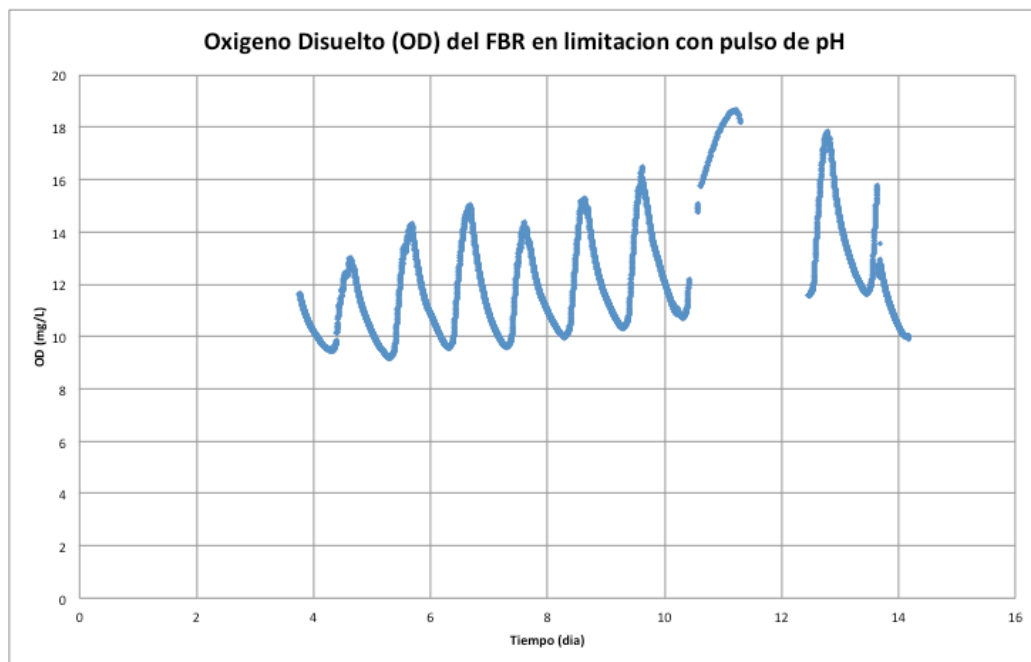
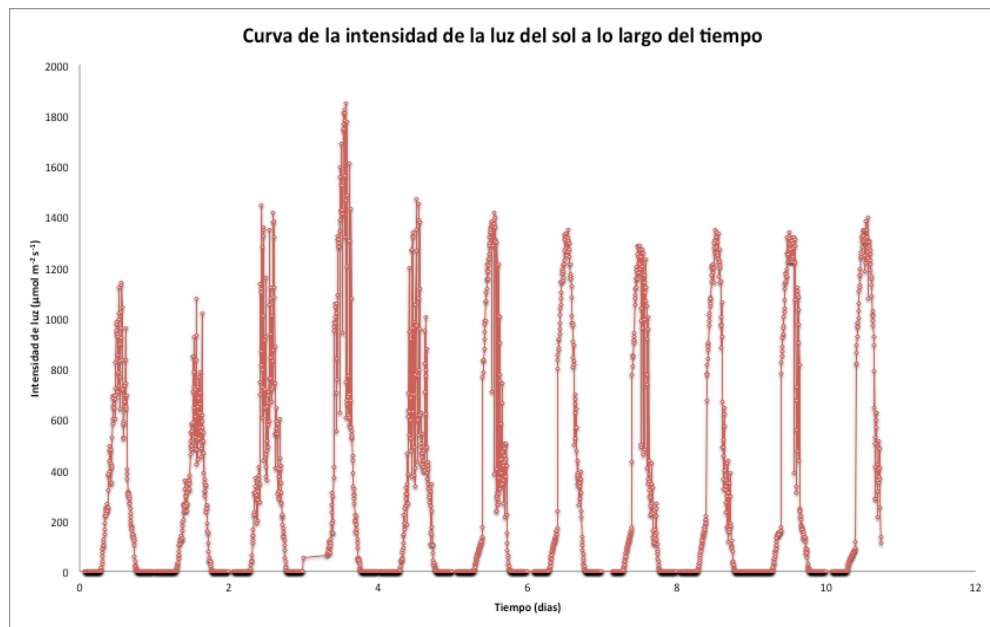


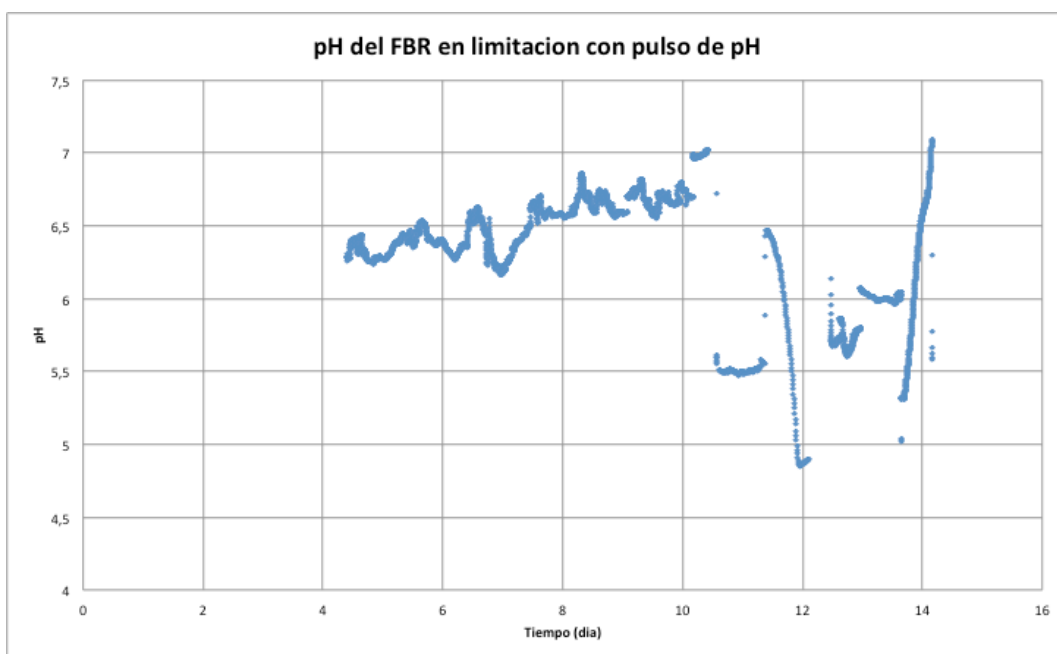


### Anexo 3 – Monitoreo del cultivo en limitación en lote - Curvas de temperatura del ambiente, del medio, del pH del cultivo y curva de intensidad de luz que llega al reactor

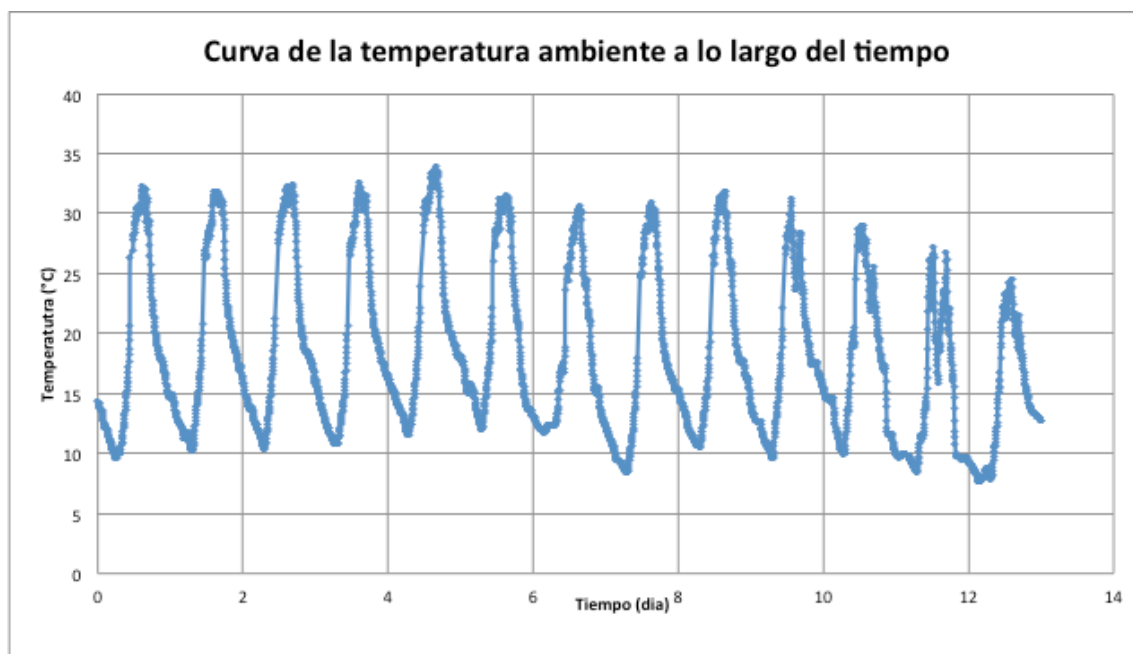
a) Curvas para el cultivo en limitacion con pulso de pH al día 10



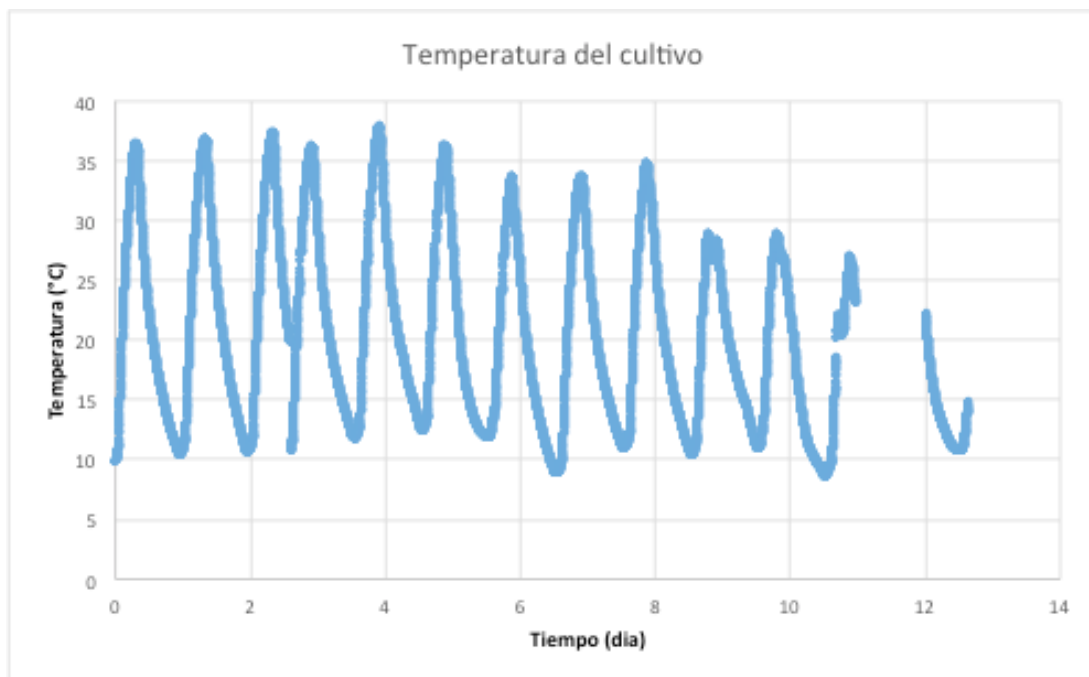
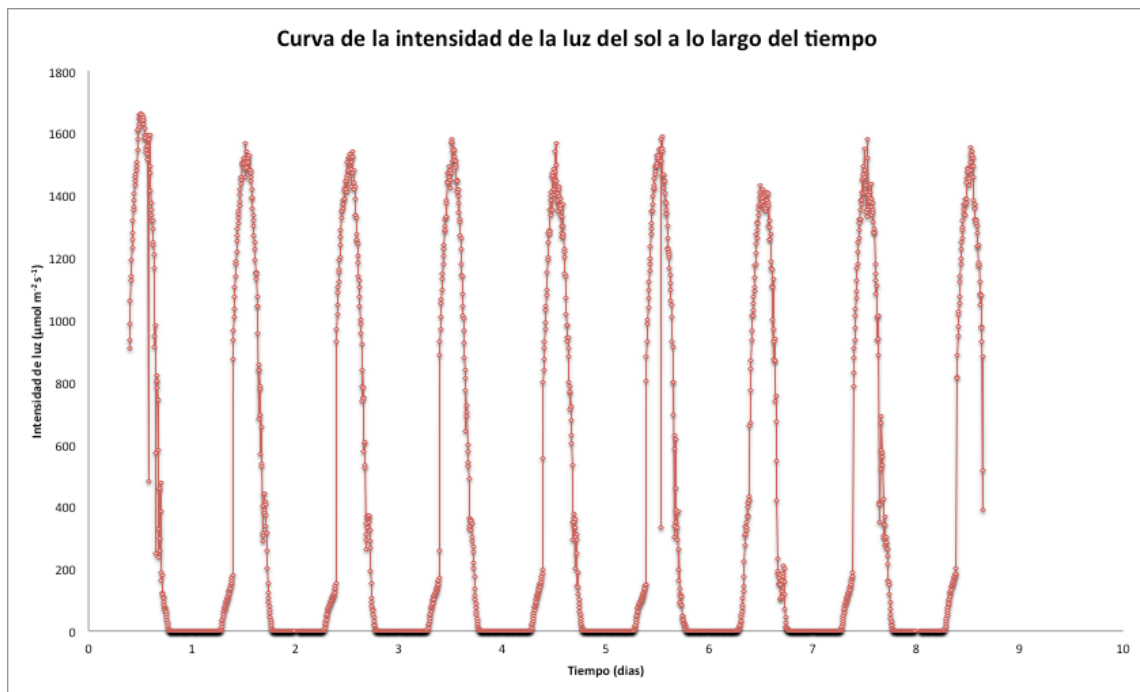




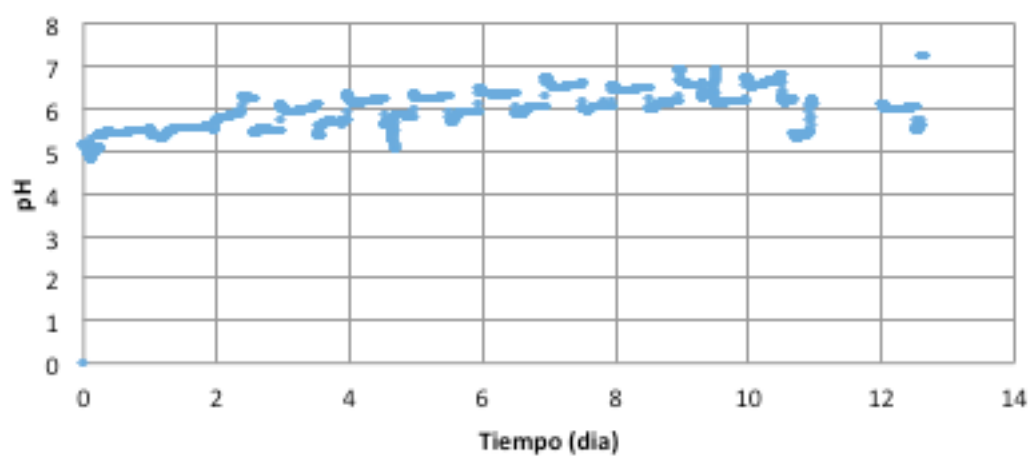
**b) Curvas para el cultivo en limitacion con pH de 5.5 al inicio**



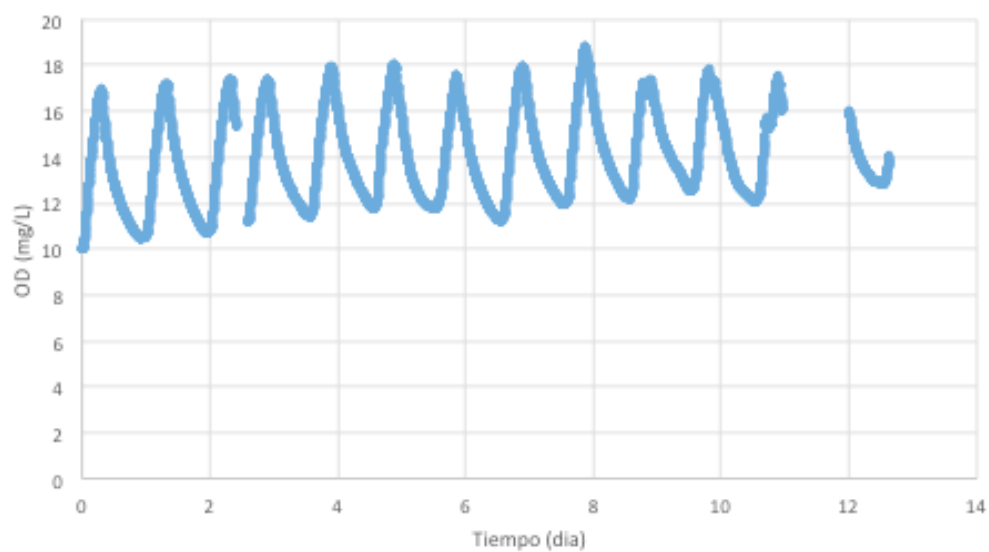




### pH en el cultivo en limitacion con pH de 5.5 al inicio



### OD en el cultivo



## Anexo 4 – Propuesta de diseño de un nuevo sedimentador

### Parámetros de diseño de un nuevo sedimentador

Datos literatura	
S (para placas)	1
$\vartheta$ viscosidad cinemática (m <sup>2</sup> /s)	1.007E-06
Datos fijados de diseño	
$v_{sc}$ (m/s)	0.000008
$\theta$ (rad)	1.04719755
$Q_{max}$ (mL/min)	25
$Q_{max}$ (m <sup>3</sup> /s)	4.1667E-07
Ancho de las placas, $l_p$ (m)	0.1
Espacio entre las placas, $e$ (m)	0.01
$L = l_p/e$	10
Longitud placas	0.12

Tabla 21 – Parámetros de diseño del sedimentador

El flujo máximo fue tomado como la tasa de dilución máxima que se puede hacer en el FBR más una margen de seguridad de 10%. La velocidad de sedimentación  $v_{sc}$  fue calculada anteriormente con la ley de Stokes. El ángulo corresponde a 60° cual es el ángulo de inclinación de las placas que tiene que ser entre 40° y 60° para evitar la acumulación de la microalga sobre la placa y porque un ángulo más grande disminuye la eficiencia del sedimentador.

$\frac{v_{sc}}{v_0} * (\sin \theta + L * \cos \theta) = S$
$v_0 = v_{sc} * (\sin \theta + L * \cos \theta)$
$v_0 = v_{sc} * (\sin \theta + (L - 0.058 * R_e) * \cos \theta)$
$R_e = \frac{v_0}{\vartheta}$

De la ecuación (1) obtenemos la (2) reemplazando S por su valor.

El primer paso consiste en calcular  $v_0$  con la ecuación xx (la 2). Luego se calcula el Reynolds con la ecuación xx (la 4) y se recalculó  $v_0$  con la ecuación xx (la 4). Se recalcula el Reynolds con ese nuevo valor

hasta obtener la misma o casi misma valor de  $v_0$ . Luego se calcula el número de canales, N, entre la placas requisitas a partir de la velocidad encontrada y de los datos de la tabla xx arriba con la ecuación (redondeando al superior):

$$N = \frac{Q_{max}}{v_0} * \frac{1}{e} * \frac{1}{Longitud\ placas}$$

$$N_{bis} = N + 1$$

La profundidad se calcula como  $h=1.25 \cdot l_p$ .

Luego con la ayuda de la ecuación siguiente calculamos la longitud ocupada por las placas en el sedimentador y de eso sacaremos la área y el volumen:

$$L_{ocupada} = l_p * \cos \theta + \frac{(N * e + N_{bis} * 0.002)}{\sin \theta}$$

Por fin, la área minima nueva y su volumen para el sedimentador son:

$$A_{mini} = L_{ocupada} * Longitud\ placas$$

$$V_{sedimentador} = A_{mini} * h$$

La tabla abajo presenta los resultados obtenidos:

<b>N (canales)</b>	<b>8</b>
<b>N+1 (placas)</b>	<b>9</b>
<b>L<sub>ocupada</sub></b>	<b>0.163</b>
<b>A<sub>mini,nueva</sub></b>	<b>0.0196</b>
<b>V<sub>sed</sub></b>	<b>2.448</b>

Tabla 22 – Volumen del sedimentador y número de placas

En realidad, la altura h corresponde a la profundidad requerida para que las placas sean sumergidas. Falta diseñar la parte abajo o sea la salida del cultivo pre concentrado. Se puede realizar varias configuraciones que permiten la salida de la biomasa: cónico o pirámide. El más común es la forma piramidal. Ya que tenemos la longitud y el ancho de las placas hay que añadir las cámaras de entrada y de salida y obtenemos la longitud total y el ancho total del sedimentador o sea la base de la pirámide. Luego, sabiendo el ángulo mínimo 60°-65°, a lo cual no hará acumulación de biomasa al fondo del sedimentador, se obtiene las dimensiones de la pirámide.

La cámara de entrada tiene que llevar varias huecos para tener un flujo homogeneizado y con poca difusión. Los huecos tienen que repartirse de manera homogeneizada y simétrica.

## **Anexo 5 – Recomendaciones**

Fue observado durante los experimentos de cultivo en limitacion que el metodo de rojo de Nilo presentaba desviaciones importantes según la micro ondas usada. Seria recomendable de infirmar o confirmar esa observacion realizando un estudio de ese metodo y revisando la curva patron de lípidos.

Seria recomendable de pasar a un sistema de produccion de escala industrial tipo planta piloto (miles de litros) para implementar equipos industriales en el fin de conocer de manera mas precisa el costo energetico y el costo global de produccion tanto en el fin de realizar ahorros que de identificar los puntos a mejorar.

## Anexo 6 – Tabla de precios del kWh, script de la simulación en EES (ecuaciones planteadas, resultados, tablas paramétricas y curvas asociadas)

	Francia (€/kWh)	EE.UU (\$/kWh)	Mexico (Peso Mexicano (MXN)/kWh)
<b>Precio kWh por país (precio/kWh)</b>	0.1400	0.1200	0.8000
Precio kWh teniendo por referencia el coste del kWh en Francia (cambio: 1€=1,09\$, 1€=16,7MXN)	0.1400	0.1526	2.3380
<b>Precio kWh teniendo por referencia el coste del kWh en USA (cambio: 1\$=15,4MXN, 1\$=0,92€)</b>	0.1104	0.1200	1.8480
Precio kWh teniendo por referencia el coste del kWh en Mexico (cambio: 1\$=15,4 MXN, 1€=16,7MXN)	0.0479	0.0519	0.8000

*Tabla 23 – Precio energía por país en su moneda y precio energía con un país de referencia*

Puntos	Flujo (kg/s)	Presión (bar)	Temperatura (°C)
1 (cultivo)	$2.379 \cdot 10^{-4}$	0.780	16.6
2 (cultivo)	$2.379 \cdot 10^{-4}$	0.780	16.6
3 (aire/CO <sub>2</sub> )	$1.838 \cdot 10^{-4} / 2.8 \cdot 10^{-6}$	5.51	16.6
4 (cultivo)	$2.379 \cdot 10^{-4}$	0.780	16.6
5 (cultivo)	$2.379 \cdot 10^{-4}$	0.780	16.6
6 (biomasa en agua residual)	$4.521 \cdot 10^{-5}$	0.780	16.6
7 (biomasa concentrada)	$1.927 \cdot 10^{-4}$	0.780	16.6
8 (agua residual)	-	0.780	16.6
9 (pasta de biomasa)	-	0.780	16.6
10 (biomasa seca)	-	0.780	70
11 (vapor de	-	0.780	70

agua)			
12 (aire/CO <sub>2</sub> )	$1.838 \cdot 10^{-4} / 2.8 \cdot 10^{-6}$	0.780	16.6

Tabla 24 – Puntos esquema XX

"=====FBR - BATCH====="	
n_dia_batch=16 [d]	"Numero de dia de cultivo en dia"
{C_batch=3,45}	"Concentracion cultivo en g/L"
"=====FBR - CONTINUO====="	
"Variables independientes: Diametro D, altura cultivo h_cultivo, mu_max, n_dia_cultivo, horas_sol, n_fotones (se podria calcular un valor promedio para dia con sol y dia nublado)"	
E_luz=n_fotones*10E-6*N_A*epsilon_foton*A/1000 [kJ]	"Energia de la luz sobre 10 dias en kJ"
D=0.143 [m]	"Diametro reactor en m"
h_cultivo=1.494 [m]	"Altura o longitud del cultivo en columna en m"
V_FBR=h_cultivo*((D/2)^2*pi)*1000	"Volumen FBR en L"
P_fase_exponencial=0.198 [g/(L.d)]	"Productividad promedia durante la fase exponencial g/L.dia"
HV=21[kJ/g]	"Calor especifico microalga en kJ/g"
E_N=1.25	
Eta_fotosintetica=(P_fase_exponencial*n_dia_continuo*V_FBR*HV*E_N)/E_luz	
E_acumulada=eta_fotosintetica*E_luz	"Energia acumulada por la microalga en kJ"
N_A=6.022E+23	"Numero de Avogadro"
epsilon_foton=3.61418E-19 [J]	"Energia de un foton"
n_fotones=227699125.2	"Cantidad de foton que llegaron al reactor sobre un periodo de dias (en ese caso 10 dias) en fotones por metro cuadrado"
A=2*PI*D/2*((V_FBR/1000)/((D/2)^2*PI))	"Area iluminada del reactor en m2"
horas_sol=10	"horas de sol diario"
{C=1}	"Concentracion cultivo en g/L"
n_dia_continuo=10	"Numero de dia de cultivo en dia"
"Tasa de dilucion"	
mu_max=0.357	
mu_max_h=mu_max/horas_sol	"para poner en h-1, menos horas mas grande puede ser la dilucion"
D_i=mu_max_h*V_FBR/1000/3600	"Tasa de dilucion en m3/s"
"=====RACEWAY (RW)====="	
n_dia_rw=18	"Numero de dia de cultivo en dia"
{C_rw=0,8}	"Concentracion cultivo en g/L"
V_rw=150	"Volumen RW en L"
"Tasa de dilucion rw"	
mu_max_rw=0.555	"coresponde a la 0,8 g/L"
mu_max_h_rw=mu_max_rw/horas_sol	"para poner en h-1, menos horas mas grande puede ser la dilucion"
D_i_rw=mu_max_h_rw*V_rw/1000/3600	"Tasa de dilucion en m3/s"



# "=====PRODUCCION DE BIOMASA====="

m\_biomasa\_continuo=C\*(D\_i\*1000\*3600\*horas\_sol)\*n\_dia\_continuo/1000 "Produccion en n\_dia\_continuo en kg"

m\_biomasa\_batch=V\_FBR\*C\_batch/1000 "Produccion en el batch en kg"

m\_biomasa\_rw=V\_rw\*C\_rw/1000 "Produccion en el RW en kg"

m\_biomasa\_rw\_con=C\_rw\*(D\_i\_rw\*1000\*3600\*horas\_sol)\*n\_dia\_rw/1000

m\_dot\_biomasa\_continuo=m\_biomasa\_continuo/n\_dia\_continuo/24

m\_dot\_biomasa\_batch=m\_biomasa\_batch/n\_dia\_batch/24

m\_dot\_biomasa\_rw=m\_biomasa\_rw/n\_dia\_rw/24

# "=====COMPRESSOR AIRE====="

"El compresor de aire funciona 24h/24 (mantener el mezclado)"

T\_ambiente=16.6+273.15  
año en K"

"Temperatura promedia en Mexico en el

V\_dot\_a=9

"Caudal aire en L/min"

V\_dot\_aire=V\_dot\_a/1000/60

"Caudal aire en m3/s"

rho\_aire=1.225

"Masa volumica del aire en kg/m3"

T[1]=T\_ambiente

"Temperatura entrada compresor en K"

P[1]=0.77989853

"Presion a la entrada del compresor/del

medio ambiente en bar"

P[2]=5.515808

"Presion a la salida del compresor en

bar"

eta\_isen\_c=0.85

"Rendimiento isoentropico del

compressor"

eta\_electromecanico\_c=0.91

eta\_m\_c=0.85

m[1]=V\_dot\_aire\*rho\_aire

"Caudal de aire a la entrada del

compressor en kg/s"

"Caudal de aire a la salida (que alimenta el

m[1]=m[2]

FBR) en kg/s"

RP=P[2]/P[1]

eta\_isen\_c=(T\_2s-T[1])/(T[2]-T[1])

"Eficiencia isentropica del compresor"

T\_2s/T[1]=(RP)^((gamma\_c-1)/gamma\_c)

"Relacion Temperatura-Presion para un

proceso isoentropico"

gamma\_c=C\_p\_c/C\_v\_c

"Relacion de calores especificos"

T\_p\_c=T[1]/2+T[2]/2

"Temperatura promedia"

C\_p\_c=Cp(Air,T=T\_p\_c)

"Calor especifico a P constante en

kJ/kg.K"

C\_v\_c=Cv(Air,T=T\_p\_c)

"Calor especifico a V constante en

kJ/kg.K"

W\_c=m[1]\*C\_p\_c\*(T[2]-T[1])

"Trabajo del compresor en kW"

h[2]=Enthalpy(Air\_ha,T=T[2],P=P[2])

h2bis=Enthalpy(Air\_ha,T=T[1],P=P[2])

{Q\_c=m[1]\*(h2bis-h[2])}

"Calor evacuado por el compresor en

kW"

Cpa=Cp(Air,T=T[2])

Q\_c=m[1]\*Cpa\*(T[1]-T[2])

"W>0 si del sistema al exterior, <0 si del

exterior al sistema contrario para Q"

W\_neta\_c=W\_c-Q\_c

"Potencia que debe suministrar el

compresor al aire en kW"

$W_{real\_c} = W_{neta\_c} / \eta_{m\_c} / \eta_{electromecanico\_c}$

"=====COMPRESSOR CO2====="

"El CO2 solo funciona en las horas\_sol"

$\rho_{CO2} = 1.87$

"Masa volumica del CO2 en kg/m3"

$CO2\% = 1$

"Porcentaje del caudal CO2 de aire"

$m_{dot\_CO2} = (V_{dot\_aire} * CO2\% / 100) * \rho_{CO2}$

"Flujo masico de CO2 en kg/s"

$\eta_{isen\_c\_co2} = 0.85$

$h_{CO2[1]} = \text{Enthalpy}(\text{CarbonDioxide}, T=T[1], P=P[1])$

$\eta_{isen\_c\_co2} = (T_{2sco2} - T[1]) / (T_{CO2[2]} - T[1])$

"Eficiencia isentropica del compresor"

$T_{2sco2} / T[1] = (RP)^{((\gamma_{c2} - 1) / \gamma_{c2})}$

"Relacion Temperatura-Presion para un

proceso isoentropico"

$\gamma_{c2} = C_{p\_c2} / C_{v\_c2}$

"Relacion de calores especificos"

$T_{p\_c2} = T[1] / 2 + T_{CO2[2]} / 2$

"Temperatura promedio"

$\{C_{p\_c2} = \text{Cp}(\text{CarbonDioxide}, T=T_{p\_c2}, P=P[1])$

"Calor especifico a P constante en

kJ/kg.K"

$C_{v\_c2} = \text{Cv}(\text{CarbonDioxide}, T=T_{p\_c2}, P=P[2])$  }

"Calor especifico a V constante en

kJ/kg.K"

"Calor especifico a P constante en

kJ/kg.K"

$C_{v\_c2} = 0.636$

"Calor especifico a V constante en

kJ/kg.K"

$W_{c\_co2} = m_{dot\_CO2} * C_{p\_c2} * (T_{CO2[2]} - T[1])$

"Trabajo del compresor en kW"

$h_{CO2[2]} = \text{Enthalpy}(\text{CarbonDioxide}, T=T_{CO2[2]}, P=P[2])$

$h_{2bis\_CO2} = \text{Enthalpy}(\text{CarbonDioxide}, T=T[1], P=P[2])$

$\{Q_{c\_co2} = m[1] * (h_{2bis} - h[2])\}$

"Calor evacuado por el compresor en

kW"

$C_{p\_co2} = \text{Cp}(\text{CarbonDioxide}, T=T_{CO2[2]}, P=P[2])$

$Q_{c\_co2} = m_{dot\_CO2} * C_{p\_co2} * (T[1] - T_{CO2[2]})$

$W_{neta\_co2} = W_{c\_co2} - Q_{c\_co2}$

"Potencia que debe suministrar el

compresor al CO2 en kW"

$W_{real\_co2} = W_{neta\_co2} / \eta_{m\_c} / \eta_{electromecanico\_c}$

"=====BOMBAS CULTIVO====="

"Las bombas solo funcionan en las horas\_sol"

$g = 9.81$

"gravedad en m.s-2"

$\rho_{agua} = 999.95$

"masa volumica del agua en kg/m3"

$h_{medio\_fresco} = 1$

"altura a la cual esta el medio fresco en m"

$h = (V_{FBR} / 1000) / ((D/2)^2 * \pi)$

"Altura cultivo en m"

$P_{columna} = P[1] + g * \rho_{agua} * (h - h_{medio\_fresco}) / 100000$  "Presion abajo en la columna en bar"

$P_{columna\_abajo} = P[1] + g * \rho_{agua} * h / 100000$

$m_{ag[3]} = \rho_{agua} * D_i$

"Flujo de entrada del medio fresco en

m3/s"

$m_{ag[4]} = m_{ag[3]}$

"Flujo de entrada del medio fresco en

m3/s"

$m_{ag[5]} = m_{ag[4]}$

"Flujo de salida del cultivo en m3/s"

$m_{ag[6]} = m_{ag[5]}$

"Flujo de salida del cultivo en m3/s"

$T[3] = T[1]$

T[4]=T[3]  
T[5]=T[4]  
T[5]=T[6]

P[3]=P[1]  
P[4]=P[1]+P\_columna  
P[5]=P[1]  
P[6]=P[1]

h[3]=Enthalpy(Water,T=T[3],P=P[3])  
h[4]=Enthalpy(Water,T=T[4],P=P[4])  
h[5]=Enthalpy(Water,T=T[5],P=P[5])  
h[6]=Enthalpy(Water,T=T[6],P=P[6])

W\_b1=m\_ag[3]\*(h[4]-h[3])  
W\_b2=m\_ag[3]\*(h[6]-h[5])

"Bomba circulacion agua RW"

P\_b\_rw=0.37 [kW]

"kW"

"=====SEDIMENTADOR====="

"Datos sedimentacion microalga"

d\_microalga=10E-6

"diametro microalga"

d\_int=0

"diametro interior de diafragma para el

flujo"

rho\_microalga=1405

"Masa volumica de la microalga en kg/m3"

mu\_agua=0.001\*rho\_agua

"Viscosidad dinamica en m2/s"

h\_L= 0.02

"altura del volante de liquido"

eta\_separacion\_sed=0.81

"Eficiencia de separacion"

V\_dot\_alim\_sed=25

"flujo entrada sed en mL/min"

{Continuo}

V\_dot\_entrada\_sed=D\_i

"Caudal de cultivo a la entrada del

sedimentador = caudal de la tasa de dilucion en m3/s"

V\_dot\_concentrado=1/4\*V\_dot\_entrada\_sed

"Caudal de cultivo concentrado del

sedimentador = caudal de la tasa de dilucion en m3/s"

V\_dot\_salida\_residual=V\_dot\_entrada\_sed-V\_dot\_concentrado "Caudal del agua residual del  
sedimentador = caudal de la tasa de dilucion en m3/s"

m\_dot\_entrada\_sed=(V\_dot\_entrada\_sed\*1000)\*C

m\_dot\_concentrado=m\_dot\_entrada\_sed\*eta\_separacion\_sed

m\_dot\_residual=m\_dot\_entrada\_sed\*(C\*(1-eta\_separacion\_sed))

C\_concentrado=m\_dot\_concentrado/(V\_dot\_concentrado\*1000)

C\_residual=m\_dot\_residual/(V\_dot\_concentrado\*1000)

{Batch}

V\_dot\_entrada\_sed\_batch=V\_dot\_alim\_sed/60/1000/1000 "Caudal de cultivo a la entrada del  
sedimentador de 25 mL/min transformado en m3/s"

V\_dot\_concentrado\_batch=1/4\*V\_dot\_entrada\_sed\_batch "Caudal de cultivo concentrado del  
sedimentador en m3/s"

V\_dot\_sal\_resi\_batch=V\_dot\_entrada\_sed\_batch-V\_dot\_concentrado\_batch "Caudal del agua  
residual del sedimentador = caudal de la tasa de dilucion en m3/s"

m\_dot\_entrada\_sed\_batch=(V\_dot\_entrada\_sed\_batch\*1000)\*C

m\_dot\_concentrado\_batch=m\_dot\_entrada\_sed\_batch\*eta\_separacion\_sed

```

m_dot_residual_batch=m_dot_entrada_sed_batch*(C*(1-eta_separacion_sed))

C_concentrado_batch=m_dot_concentrado_batch/(V_dot_concentrado_batch*1000)
C_residual_batch=m_dot_residual_batch/(V_dot_concentrado_batch*1000)

t_tratar_batch=(V_FBR/1000)/(V_dot_entrada_sed_batch*3600) "Tiempo para tratar el volumen en h"
V_batch_tratado=t_tratar_batch*(V_dot_concentrado_batch*1000*3600) "Volumen de biomasa concentrada recuperado despues de la sedimentacion en L"

{RW - batch}
V_dot_entrada_sed_rw=V_dot_alim_sed/60/1000/1000 "Caudal de cultivo a la entrada del sedimentador de 25 mL/min transformado en m3/s"
V_dot_concentrado_rw=1/4*V_dot_entrada_sed_rw "Caudal de cultivo concentrado del sedimentador en m3/s"
V_dot_sal_resi_rw=V_dot_entrada_sed_rw-V_dot_concentrado_rw "Caudal del agua residual del sedimentador = caudal de la tasa de dilucion en m3/s"

m_dot_entrada_sed_rw=(V_dot_entrada_sed_rw*1000)*C
m_dot_concentrado_rw=m_dot_entrada_sed_rw*eta_separacion_sed
m_dot_residual_rw=m_dot_entrada_sed_rw*(C*(1-eta_separacion_sed))

C_concentrado_rw=m_dot_concentrado_rw/(V_dot_concentrado_rw*1000)
C_residual_rw=m_dot_residual_rw/(V_dot_concentrado_rw*1000)

t_tratar_rw=(V_rw/1000)/(V_dot_entrada_sed_rw*3600) "Tiempo para tratar el volumen en h"
V_rw_tratado=t_tratar_rw*(V_dot_concentrado_rw*1000*3600) "Volumen de biomasa concentrada recuperado despues de la sedimentacion en L"

{RW - continuo}
V_dot_ent_sed_rw_cont=D_i_rw "Caudal de cultivo a la entrada del sedimentador = caudal de la tasa de dilucion en m3/s"
V_dot_concen_rw_cont=1/4*V_dot_ent_sed_rw_cont "Caudal de cultivo concentrado del sedimentador = caudal de la tasa de dilucion en m3/s"
V_dot_salida_resi_rw_cont=V_dot_ent_sed_rw_cont-V_dot_concen_rw_cont "Caudal del agua residual del sedimentador = caudal de la tasa de dilucion en m3/s"

m_dot_ent_rw_cont=(V_dot_ent_sed_rw_cont*1000)*C_rw
m_dot_concen_rw_cont=m_dot_ent_rw_cont*eta_separacion_sed
m_dot_resi_rw_cont=m_dot_ent_rw_cont*(C_rw*(1-eta_separacion_sed))

C_concen_rw_cont=m_dot_concen_rw_cont/(V_dot_concen_rw_cont*1000)
C_resi_rw_cont=m_dot_resi_rw_cont/(V_dot_concen_rw_cont*1000)

"=====BALANCE ENERGIA CENTRIFUGACION=====
"Datos centrifuga"
P_centrifuga=650 "Potencia centrifuga en W"
t_centrifuga=7 "Tiempo en min para centrifugar 1L"
"E_centrifuga=650*t_centrifuga/60/1000" "Energia para centrifugar 1L en kWh"

{omega=4000*2*pi/60 "Velocidad de rotacion de la centrifuga en rad/s, 4000 en rpm"
N=r*omega^2/g "Numero de g"
r=0.02 "Radio de los botes en m"
{C= "Cople motor centrifuga"}
"Flujo volumetrico o masico a tratar sin sed"
V_tratar=D_i

```

$v_{sed\_centrifuga} = (d\_microalga^2 * (\rho_{microalga} - \rho_{agua}) * N * g) / (18 * \mu_{agua})$  "velocidad sedimentacion microalga en la centrifuga en m/s"  
 $S = \pi * (r^2 - (d\_int/2)^2)$  "Seccion de flujo"  
 $V\_linear = D\_i / S$  "Velocidad lineal del flujo con respecto al flujo de alimentacion si estuviera una centrifuga continua en m/s"  
 $L\_utile = h\_L * (V\_linear / v_{sed\_centrifuga})$  "Longitud para que se pegan a la pared"  
 $L = 0.1$  "Longitud efectiva en m"  
 $t\_residencia\_centrifuga = L / V\_linear / 60$  "Tiempo de residencia en min"  
 $\{V\_S\_lim = V\_linear * (h\_L / L)\}$   
 $\{d\_lim = \sqrt{(V\_S\_lim * 18 * \mu_{agua}) / (N * g * (\rho_{microalga} - \rho_{agua}))} * 1000000$  "en m"}  
 "Volumen a tratar x Energia requerida (formula/funcion)"  
 "Centrifugacion: 1L/7min"  
 "v\_sed=leydestoke"  
 "Seccion botes"  
 "=> vsedimentacion inducida"  
 "Potencia motor a relacionar con velocidad de rotacion"  
 "P(potencia)=C\*w con w=velocidad de rotacion del motor en rad/s, c=couple moteur en N.m y P en W"  
 "C=F\*r, con r el radio"  
  
 "=====ENERGIA CONSUMIDA POR LOS CULTIVOS===== "  
 {Continuo - Energia requerida y consomacion especifica}  
 $E\_aire\_continuo = W\_real\_c * n\_dia\_continuo * 24$  "Energia consumida para un cultivo continuo de n\_dia\_continuo en kWh"  
 $E\_b1\_continuo = W\_b1 * horas\_sol * n\_dia\_continuo$  "Energia consumida para las bombas de un cultivo continuo de n\_dia\_continuo con horas\_sol en kWh"  
 $E\_b2\_continuo = W\_b2 * horas\_sol * n\_dia\_continuo$   
 $E\_co2\_continuo = W\_real\_co2 * horas\_sol * n\_dia\_continuo$  "Energia consumida para un cultivo de n\_dia\_continuo con horas\_sol en kWh"  
  
 $E\_total\_cultivo\_continuo = E\_b1\_continuo + E\_b2\_continuo + E\_co2\_continuo + E\_aire\_continuo$   
 "Energia consumida por el cultivo en n\_dia\_continuo"  
 $CE\_continuo = E\_total\_cultivo\_continuo / m\_biomasa\_continuo$  "en kWh/kg, solo el cultivo"  
 $CE\_euro\_continuo = CE\_continuo * 0.05374623$  "en Euro/kg"  
  
 $E\_centrifuga\_continuo = (P\_centrifuga / 1000) * (t\_centrifuga / 60) * (D\_i * 1000 * 3600 * horas\_sol * n\_dia\_continuo)$  "Energia consumida para centrifugar un cultivo de n\_dia"  
 $CE\_centrifuga\_continuo = E\_centrifuga\_continuo / m\_biomasa\_continuo$  "Solo la centrifugacion"  
 $CE\_total\_centrifug\_conti = (E\_total\_cultivo\_continuo + E\_centrifuga\_continuo) / m\_biomasa\_continuo$  "en kWh/kg, cultivo+centrifugacion"  
  
 $E\_concen\_centrifug\_conti = (P\_centrifuga / 1000) * (t\_centrifuga / 60) * (V\_dot\_concentrado * 1000 * 3600 * horas\_sol * n\_dia\_continuo)$  "Energia consumida para centrifugar + sedimentador antes"  
 $CE\_concen\_centrifug\_conti = E\_concen\_centrifug\_conti / m\_biomasa\_continuo$  "Solo la centrifugacion con sedimentacion antes"  
 $CE\_total\_concen\_conti = (E\_total\_cultivo\_continuo + E\_concen\_centrifug\_conti) / m\_biomasa\_continuo$   
  
 {Batch - Energia requerida y consomacion especifica}  
 $E\_aire\_batch = W\_real\_c * n\_dia\_batch * 24$  "Energia consumida para un cultivo continuo de n\_dia\_continuo en kWh"  
 $E\_co2\_batch = W\_real\_co2 * horas\_sol * n\_dia\_batch$   
  
 $E\_total\_cultivo\_batch = E\_co2\_batch + E\_aire\_batch$   
 $CE\_batch = E\_total\_cultivo\_batch / m\_biomasa\_batch$   
  
 $E\_centrifuga\_batch = (P\_centrifuga / 1000) * (t\_centrifuga / 60) * V\_FBR$

$CE_{centrifuga\_batch} = E_{centrifuga\_batch} / m_{biomasa\_batch}$  "Solo la centrifugacion"  
 $CE_{total\_centrifuga\_batch} = (E_{total\_cultivo\_batch} + E_{centrifuga\_batch}) / m_{biomasa\_batch}$  "en kWh/kg, cultivo+centrifugacion"

$E_{concen\_centrifuga\_batch} = (P_{centrifuga} / 1000) * (t_{centrifuga} / 60) * V_{batch\_tratado}$  "Energia consumida para centrifugar + sedimentador antes"  
 $CE_{concen\_centrifuga\_batch} = E_{concen\_centrifuga\_batch} / m_{biomasa\_batch}$  "Solo la centrifugacion con sedimentacion antes"  
 $CE_{total\_concen\_batch} = (E_{total\_cultivo\_batch} + E_{concen\_centrifuga\_batch}) / m_{biomasa\_batch}$

{RW - Energia requerida y consumacion especifica}  
 $E_{total\_cultivo\_rw} = P_{b\_rw} * 24 * n_{dia\_rw}$   
 $CE_{rw} = E_{total\_cultivo\_rw} / m_{biomasa\_rw}$

$E_{centrifuga\_rw} = (P_{centrifuga} / 1000) * (t_{centrifuga} / 60) * V_{rw}$   
 $CE_{centrifuga\_rw} = E_{centrifuga\_rw} / m_{biomasa\_rw}$  "Solo la centrifugacion"  
 $CE_{total\_centrifuga\_rw} = (E_{total\_cultivo\_rw} + E_{centrifuga\_rw}) / m_{biomasa\_rw}$  "en kWh/kg, cultivo+centrifugacion"

$E_{concen\_centrifuga\_rw} = (P_{centrifuga} / 1000) * (t_{centrifuga} / 60) * V_{rw\_tratado}$  "Energia consumida para centrifugar + sedimentador antes"  
 $CE_{concen\_centrifuga\_rw} = E_{concen\_centrifuga\_rw} / m_{biomasa\_rw}$  "Solo la centrifugacion con sedimentacion antes"  
 $CE_{total\_concen\_rw} = (E_{total\_cultivo\_rw} + E_{concen\_centrifuga\_rw}) / m_{biomasa\_rw}$

"RW continuo"  
 $W_{b\_rw} = W_{b1}$   
 $E_{rw\_continuo} = E_{total\_cultivo\_rw} + 2 * W_{b\_rw} * horas\_sol * n_{dia\_rw}$   
 $CE_{rw\_cont} = E_{rw\_continuo} / m_{biomasa\_rw\_con}$  "kWh/kg"

$E_{centri\_rw\_con} = (P_{centrifuga} / 1000) * (t_{centrifuga} / 60) * (D_{i\_rw} * 1000 * 3600 * horas\_sol * n_{dia\_rw})$   
 $CE_{centri\_rw\_con} = E_{centri\_rw\_con} / m_{biomasa\_rw\_con}$  "Solo la centrifugacion"  
 $CE_{total\_centri\_rw\_con} = (E_{rw\_continuo} + E_{centri\_rw\_con}) / m_{biomasa\_rw\_con}$  "en kWh/kg, cultivo+centrifugacion"

$E_{concen\_conti\_rw} = (P_{centrifuga} / 1000) * (t_{centrifuga} / 60) * (V_{dot\_concen\_rw\_cont} * 1000 * 3600 * horas\_sol * n_{dia\_rw})$  "Energia consumida para centrifugar + sedimentador antes"  
 $CE_{concen\_conti\_rw} = E_{concen\_conti\_rw} / m_{biomasa\_rw\_con}$  "Solo la centrifugacion con sedimentacion antes"  
 $CE_{total\_concen\_con\_rw} = (E_{rw\_continuo} + E_{concen\_conti\_rw}) / m_{biomasa\_rw\_con}$

$C_{ellos} = 0.7$   
 $E_{ellos} = 66677 / 333 * 10$   
 $m_{biomasa\_ellos} = 25 * 12 * 10 * 147.9 / 1000$   
 $Ellos2 = E_{ellos} / m_{biomasa\_ellos}$

# SOLUTION

Unit Settings: SI K bar kJ mass deg

$$A = 0,6712 \text{ [m}^2\text{]}$$

$$CE_{batch} = 569,7 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{centrifuga,continuo} = 75,83 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{centri,rw,con} = 94,79$$

$$CE_{concen,centrif,conti} = 18,96 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{concen,centri,rw} = 23,7 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{euro,continuo} = 18,5$$

$$CE_{rw,cont} = 133,3 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{total,centrif,conti} = 420 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{total,centri,rw,con} = 228,1 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{total,concen,conti} = 363,1 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{total,concen,rw} = 1356 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$C = 1 \text{ [g/L]}$$

$$CE_{centrifuga,batch} = 21,98 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{centrifuga,rw} = 94,79 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{concen,centrif,batch} = 5,495 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{concen,centrif,rw} = 23,7 \text{ [kWh/kg]}$$

$$CE_{continuo} = 344,1 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{rw} = 1332 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{total,centrif,batch} = 591,7 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{total,centrif,rw} = 1427 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{total,concen,batch} = 575,2 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CE_{total,concen,con,rw} = 157 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$CO_2\% = 1 \text{ [%]}$$

$$C_{pa} = 1,038 \text{ [kJ/kg.K]}$$

$$C_{batch} = 3,45 \text{ [g/L]}$$

$$C_{concentrado,batch} = 3,24 \text{ [g/L]}$$

$$C_{concen,rw,cont} = 2,592$$

$$C_{p,c} = 1,015 \text{ [kJ/kg.K]}$$

$$C_{residual} = 0,76$$

$$C_{residual,rw} = 0,76 \text{ [g/L]}$$

$$C_{rw} = 0,8 \text{ [g/L]}$$

$$C_{v,c2} = 0,636 \text{ [kJ/kg.K]}$$

$$D_i = 2,379E-07 \text{ [m}^2\text{/s]}$$

$$D_{i,rw} = 0,000002313$$

$$E_{llos2} = 4,513 \text{ [kWh/kg}_{biomasa}\text{]}$$

$$\eta_{electromecanico,c} = 0,91$$

$$\eta_{isen,c} = 0,85$$

$$\eta_{m,c} = 0,85$$

$$E_{acumulada} = 1247 \text{ [kJ]}$$

$$E_{aire,continuo} = 29,47 \text{ [kWh]}$$

$$E_{b2,continuo} = 0 \text{ [kWh]}$$

$$E_{centrifuga,continuo} = 6,496 \text{ [kWh]}$$

$$E_{centri,rw,con} = 113,6 \text{ [kWh]}$$

$$E_{co2,continuo} = 0,008178 \text{ [kWh]}$$

$$E_{concen,centrif,conti} = 1,624 \text{ [kWh]}$$

$$E_{concen,centri,rw} = 28,41 \text{ [kWh]}$$

$$E_{luz} = 332620 \text{ [kJ]}$$

$$E_{rw,continuo} = 159,8 \text{ [kWh]}$$

$$E_{total,cultivo,continuo} = 29,48 \text{ [kWh]}$$

$$C_{pco2} = 0,8873 \text{ [kJ/kg.K]}$$

$$C_{concentrado} = 3,24 \text{ [g/L]}$$

$$C_{concentrado,rw} = 3,24 \text{ [g/L]}$$

$$C_{ellos} = 0,7 \text{ [g/L]}$$

$$C_{p,c2} = 0,65 \text{ [kJ/kg.K]}$$

$$C_{residual,batch} = 0,76 \text{ [g/L]}$$

$$C_{resi,rw,cont} = 0,4864$$

$$C_{v,c} = 0,7283 \text{ [kJ/kg.K]}$$

$$D = 0,143 \text{ [m]}$$

$$d_{int} = 0 \text{ [m]}$$

$$d_{microalga} = 0,00001 \text{ [m]}$$

$$g_{foton} = 3,614E-19 \text{ [J]}$$

$$\eta_{fotosintetica} = 0,003749$$

$$\eta_{isen,c,co2} = 0,85$$

$$\eta_{separacion,sed} = 0,81$$

$$E_{aire,batch} = 47,15 \text{ [kWh]}$$

$$E_{b1,continuo} = 0,001875 \text{ [kWh]}$$

$$E_{centrifuga,batch} = 1,82 \text{ [kWh]}$$

$$E_{centrifuga,rw} = 11,38 \text{ [kWh]}$$

$$E_{co2,batch} = 0,01308 \text{ [kWh]}$$

$$E_{concen,centrif,batch} = 0,4549 \text{ [kWh]}$$

$$E_{concen,centrif,rw} = 2,844 \text{ [kWh]}$$

$$E_{ellos} = 2002 \text{ [kWh]}$$

$$EN = 1,25$$

$$E_{total,cultivo,batch} = 47,16 \text{ [kWh]}$$

$$E_{total,cultivo,rw} = 159,8 \text{ [kWh]}$$



$g = 9,81 \text{ [m/s}^2\text{]}$   
 $\gamma_{c2} = 1,022$   
 $h_{2bis} = 288,9 \text{ [kJ/kg]}$   
 $horas_{sol} = 10 \text{ [h]}$   
 $h_{cultivo} = 1,494 \text{ [m]}$   
 $h_{medio,fresco} = 1 \text{ [m]}$   
 $\mu_{max} = 0,357 \text{ [d}^{-1}\text{]}$   
 $\mu_{max,h,rw} = 0,0555$   
 $m_{biomasa,batch} = 0,08278 \text{ [kg]}$   
 $m_{biomasa,eflcs} = 443,7 \text{ [kg]}$   
 $m_{biomasa,rw,con} = 1,199$   
 $\dot{m}_{biomasa,continuo} = 0,0003569 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{CO2} = 0,000002805 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{concentrado,batch} = 0,0003375 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{concen,rw,cont} = 0,001499$   
 $\dot{m}_{entrada,sed,batch} = 0,0004167 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{ent,rw,cont} = 0,00185$   
 $\dot{m}_{residual,batch} = 0,00007917 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{resi,rw,cont} = 0,0002812$   
 $n_{dia,batch} = 16 \text{ [d]}$   
 $n_{dia,rw} = 18 \text{ [d]}$   
 $P_{b,rw} = 0,37 \text{ [kW]}$   
 $P_{columna} = 0,8284 \text{ [bar]}$   
 $P_{fase,exponencial} = 0,198 \text{ [g/(L.d)]}$   
 $Q_{c,co2} = -0,00003651 \text{ [kW]}$   
 $\rho_{aire} = 1,225 \text{ [kg/m}^3\text{]}$   
 $\rho_{microalga} = 1405 \text{ [kg/m}^3\text{]}$   
 $T_{2s} = 503,7 \text{ [K]}$   
 $T_{ambiente} = 289,8 \text{ [K]}$   
 $T_{p,c} = 415,6 \text{ [K]}$   
 $t_{tratar,batch} = 16 \text{ [h]}$   
 $V_{batch,tratado} = 5,999 \text{ [L]}$   
 $\dot{V}_{aire} = 0,00015 \text{ [m}^3\text{/s]}$   
 $\dot{V}_{concentrado} = 5,949E-08 \text{ [m}^3\text{/s]}$

$\dot{V}_{concentrado,rw} = 1,042E-07 \text{ [m}^3\text{/s]}$   
 $\dot{V}_{entrada,sed} = 2,379E-07 \text{ [m}^3\text{/s]}$   
 $\dot{V}_{entrada,sed,rw} = 4,167E-07 \text{ [m}^3\text{/s]}$   
 $\dot{V}_{salida,residual} = 1,785E-07 \text{ [m}^3\text{/s]}$   
 $\dot{V}_{sal,resi,batch} = 3,125E-07 \text{ [m}^3\text{/s]}$   
 $V_{FBR} = 23,99 \text{ [L]}$   
 $V_{rw,tratado} = 37,5 \text{ [L]}$   
 $W_{b2} = 0 \text{ [kW]}$   
 $W_c = 0,04697 \text{ [kW]}$   
 $W_{neta,c} = 0,09497 \text{ [kW]}$   
 $W_{real,c} = 0,1228 \text{ [kW]}$

$\gamma_c = 1,394$   
 $h = 1,494 \text{ [m]}$   
 $h_{2bisCO2} = -12,62 \text{ [kJ/kg]}$   
 $HV = 21 \text{ [kJ/g]}$   
 $h_L = 0,02 \text{ [m]}$   
 $\mu_{agua} = 1 \text{ [m}^2\text{/s]}$   
 $\mu_{max,h} = 0,0357 \text{ [h}^{-1}\text{]}$   
 $\mu_{max,rw} = 0,555$   
 $m_{biomasa,continuo} = 0,08566 \text{ [kg]}$   
 $m_{biomasa,rw} = 0,12 \text{ [kg]}$   
 $\dot{m}_{biomasa,batch} = 0,0002156 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{biomasa,rw} = 0,0002778 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{concentrado} = 0,0001927 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{concentrado,rw} = 0,0003375 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{entrada,sed} = 0,0002379 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{entrada,sed,rw} = 0,0004167 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{residual} = 0,00004521 \text{ [kg/s]}$   
 $\dot{m}_{residual,rw} = 0,00007917 \text{ [kg/s]}$   
 $N_A = 6,022E+23$   
 $n_{dia,continuo} = 10 \text{ [d]}$   
 $n_{fotones} = 2,277E+08$   
 $P_{centrifuga} = 650 \text{ [W]}$   
 $P_{columna,abajo} = 0,9265 \text{ [bar]}$   
 $Q_c = -0,048 \text{ [kW]}$   
 $\rho_{agua} = 1000 \text{ [kg/m}^3\text{]}$   
 $\rho_{CO2} = 1,87 \text{ [kg/m}^3\text{]}$   
 $RP = 7,072$   
 $T_{2sco2} = 302,2 \text{ [K]}$   
 $t_{centrifuga} = 7 \text{ [min]}$   
 $T_{p,c2} = 297,1 \text{ [K]}$   
 $t_{tratar,rw} = 100 \text{ [h]}$   
 $\dot{V}_a = 9 \text{ [L/min]}$   
 $\dot{V}_{alim,sed} = 25 \text{ [mL/min]}$   
 $\dot{V}_{concentrado,batch} = 1,042E-07 \text{ [m}^3\text{/s]}$

$\dot{V}_{concen,rw,cont} = 5,781E-07$   
 $\dot{V}_{entrada,sed,batch} = 4,167E-07 \text{ [m}^3\text{/s]}$   
 $\dot{V}_{ent,sed,rw,cont} = 0,000002313$   
 $\dot{V}_{salida,resi,rw,cont} = 0,000001734$   
 $\dot{V}_{sal,resi,rw} = 3,125E-07 \text{ [m}^3\text{/s]}$   
 $V_{rw} = 150 \text{ [L]}$   
 $W_{b1} = 0,00001875 \text{ [kW]}$   
 $W_{b,rw} = 0,00001875$   
 $W_{c,co2} = 0,00002675 \text{ [kW]}$   
 $W_{neta,co2} = 0,00006326 \text{ [kW]}$   
 $W_{real,co2} = 0,00008178 \text{ [kW]}$



Parametric Table 1006.2					
C	CE <sub>1</sub> (corresponding)	CE <sub>2</sub> (arranged in pairs)	CE <sub>3</sub> (all available)	CE <sub>4</sub> (all available)	C <sub>mean</sub>
[a <sub>1</sub> ]	[PMV1/0.000000]	[PMV1/0.000000]	[PMV1/0.000000]	[PMV1/0.000000]	[a <sub>1</sub> ]

Run 1	0.1	344.1	376.2	4200	369.1	0.1
Run 2	0.2	177.1	378.2	2100	161.5	0.2
Run 3	0.3	114.7	282.8	1400	121.0	0.3
Run 4	0.4	89.3	186.6	1030	97.7	0.4
Run 5	0.5	60.2	151.7	698.9	72.6	0.5
Run 6	0.6	57.5	126.4	568.9	65.1	0.6
Run 7	0.7	491.8	108.3	598.9	519.7	0.7
Run 8	0.8	430.1	94.79	524.5	445.8	0.8
Run 9	0.9	382.4	84.26	466.6	403.4	0.9
Run 10	1	344.1	75.53	420	353.1	1
Run 11	1.1	312.8	68.64	391.8	330.1	1.1
Run 12	1.2	285.8	61.19	350	302.6	1.2
Run 13	1.3	264.7	56.33	323	279.3	1.3
Run 14	1.4	245.9	54.17	300	259.3	1.4
Run 15	1.5	229.4	50.56	280	242.1	1.5
Run 16	1.6	215.1	47.4	262.6	228.9	1.6
Run 17	1.7	202.4	44.67	247	213.6	1.7
Run 18	1.8	191.2	42.13	232.2	201.7	1.8
Run 19	1.9	181.1	39.67	221	191.1	1.9
Run 20	2	172.1	37.92	210	181.5	2
Run 21	2.1	163.9	36.11	200	172.9	2.1
Run 22	2.2	156.4	34.47	190.9	165	2.2
Run 23	2.3	149.5	32.97	182.6	157.9	2.3
Run 24	2.4	143.4	31.6	175	151.3	2.4
Run 25	2.5	137.8	30.33	168	145.2	2.5
Run 26	2.6	132.4	29.17	161.5	139.6	2.6
Run 27	2.7	127.5	28.09	155.5	134.5	2.7
Run 28	2.8	122.9	27.08	150	129.7	2.8
Run 29	2.9	118.7	26.15	144.6	125.2	2.9
Run 30	3	114.7	25.26	140	121	3
Run 31	3.1	111		135.5	117.1	3.1
Run 32	3.2	107.5		131.2	113.5	3.2
Run 33	3.3	104.3		127.3	110	3.3
Run 34	3.4	101.2		123.5	106.8	3.4
Run 35	3.5	98.32		120	103.7	3.5

**Parameter Info Table: Table 3**

Run	Crash	Crash per 100 miles	Crash per 1000 hours	$\beta_{crash}$	$\beta_{crash}^2$
Run 1	150025	20473	15644	0.1	11474
Run 2	9027	16207	59422	0.1705	8931
Run 3	6002	6854	60710	0.2412	4733
Run 4	4874	5703	46871	0.3118	3981
Run 5	3809	4803	38009	0.3824	2905
Run 6	32786	3307	33007	0.4529	2520
Run 7	2008	2910	2005	0.5235	2100
Run 8	2457	2552	2487	0.5841	1921
Run 9	2704	2280	2205	0.6847	1717
Run 10	1665	2047	1564	0.7355	1552
Run 11	1787	1656	1604	0.8059	1418
Run 12	1658	1707	1654	0.8755	1305
Run 13	1572	1570	1528	0.9471	1202
Run 14	1404	1468	1417	1.0118	1122
Run 15	1310	1367	1323	1.079	1049
Run 16	1228	1276	1240	1.1359	985

Parametric Tests, Table 2			
CE mean	CE non-significant	CE mean significant	$C_m$
[WV]NoControl	[WV]NoControl	[WV]NoControl	[WV]NoControl
			[C <sub>0</sub> ]
			CE significant
			[WV]NoControl

Run 17	7106	7287	7167	1.229	9324.9
Run 18	7082	7154	7102	1.3	679
Run 19	7034	7074	7044	1.371	932.0
Run 20	6827	7027	682.2	1.441	732
Run 21	6305.9	6727	644	1.512	755
Run 22	653.4	697.5	602	1.582	721.4
Run 23	654.6	687.5	662.6	1.653	690.5
Run 24	676.5	690.5	626.6	1.724	662.3
Run 25	708.2	676.5	753.6	1.794	638.2
Run 26	706	766.7	703.2	1.865	612.1
Run 27	726	726	735	1.935	590.8
Run 28	702	729	705.7	2.005	559
Run 29	677.7	705.5	684.5	2.078	540.7
Run 30	655.2	690.4	657.0	2.147	531.5
Run 31	634	658.5	640.7	2.218	514.7
Run 32	614.2	637.0	620.7	2.288	498.0
Run 33	595.0	616.6	607.3	2.359	480.0
Run 34	576.7	593.7	583.7	2.429	459.0
Run 35	557.6	583.2	567	2.5	435.0

### Parametric Table: Table 2

Journal	Year	Volume	Issue	Page
Journal of Management Education	2001	35	1	1-10
Journal of Management Education	2001	35	1	11-20
Journal of Management Education	2001	35	1	21-30
Journal of Management Education	2001	35	1	31-40
Journal of Management Education	2001	35	1	41-50
Journal of Management Education	2001	35	1	51-60
Journal of Management Education	2001	35	1	61-70
Journal of Management Education	2001	35	1	71-80
Journal of Management Education	2001	35	1	81-90
Journal of Management Education	2001	35	1	91-100

Run 1	10846	1025	1236	0.7	2002	4.513
Run 2	6556	1070	756.4	0.7	2002	4.513
Run 3	4407	756.7	520.9	0.7	2002	4.513
Run 4	3479	585.4	403	0.7	2002	4.513
Run 5	2037	477.3	320.6	0.7	2002	4.513
Run 6	254	402.9	277.4	0.7	2002	4.513
Run 7	2072	346.6	240	0.7	2002	4.513
Run 8	1825	207.2	211.5	0.7	2002	4.513
Run 9	1632	274.6	189	0.7	2002	4.513
Run 10	1475	246.2	170.9	0.7	2002	4.513
Run 11	1346	206.5	165.6	0.7	2002	4.513
Run 12	1237	208.2	143.3	0.7	2002	4.513
Run 13	1146	192.7	132.7	0.7	2002	4.513
Run 14	1006	179.3	123.9	0.7	2002	4.513
Run 15	905.6	167.7	115.4	0.7	2002	4.513
Run 16	825.9	157.5	108.4	0.7	2002	4.513
Run 17	882.2	148.4	102.2	0.7	2002	4.513
Run 18	804.3	140.4	96.64	0.7	2002	4.513
Run 19	709.2	123.2	91.66	0.7	2002	4.513
Run 20	732.6	126.6	87.77	0.7	2002	4.513
Run 21	717.4	120.7	83.1	0.7	2002	4.513
Run 22	686.4	115.3	78.39	0.7	2002	4.513
Run 23	666.1	110.4	78	0.7	2002	4.513
Run 24	629.3	105.9	72.69	0.7	2002	4.513
Run 25	604.5	101.7	70.02	0.7	2002	4.513
Run 26	587.6	97.87	67.37	0.7	2002	4.513
Run 27	560.4	94.3	64.81	0.7	2002	4.513
Run 28	540.7	90.58	62.63	0.7	2002	4.513
Run 29	522.3	87.98	60.5	0.7	2002	4.513
Run 30	505.7	85	58.91	0.7	2002	4.513
Run 31	486.7	82.3	56.65	0.7	2002	4.513
Run 32	474	79.75	54.9	0.7	2002	4.513

Experiment 6: Table 2

	$C_{\text{transducer}}^{\text{in}}$ [W/KgK]	$C_{\text{mix water in can}}$ [W/KgK]	$C_{\text{transducer}}^{\text{out}}$ [W/KgK]	$C_{\text{mix}}$ [J/K]	$E_{\text{loss}}$ [W/K]	$E_{\text{load}}$ [W/KgK]
Run 33	499.8	77.37	53.26	0.7	2002	4.513
Run 34	449.4	75.12	51.74	0.7	2002	4.513
Run 35	433.9	73	50.25	0.7	2002	4.513

## Anexo 7 – Código macro Excel realizado en VBA Excel para facilitar tratamiento datos del data logger de intensidad de luz

```
Sub MacroDatLuz()  
,  
  
' MacroDatLuz Macro  
,  
  
    Dim i As Integer  
    Dim Nb_ligne As Integer  
  
    'Iniciar loop  
  
    i = 1  
  
    Nb_ligne = 0  
  
    ActiveSheet .Select  
  
    Range ("A1")  
  
  
    'Bucle contar numero lineas  
    While Not (IsEmpty(ActiveCell))  
  
        'ligne = ActiveSheet .Range("Ai").End(xlUp).Row  
  
        Range ("A" & i)  
  
        Nb_ligne = Nb_ligne + 1  
  
        i = i + 1  
  
    Wend  
  
    'Range("A" & i).Paste  
  
    ActiveSheet.Range("$A$1" & ":$D$" & i).AutoFilter Field:=3, Criteria1:="Time"  
  
    Range("B2").Select  
  
    Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select  
  
    ActiveSheet.Range("$A$1" & ":$D$" & i).AutoFilter Field:=3, Criteria1:="LUX"  
  
    ActiveSheet.Range("$A$1" & ":$D$" & i).AutoFilter Field:=3, Criteria1:="Time"  
  
    Selection.Copy  
  
    Range("F2").Select  
  
    ActiveSheet.Paste
```

```

ActiveSheet.Range("$A$1" & ":$D$" & i).AutoFilter Field:=3
'ActiveSheet.Paste'
ActiveSheet.Range("$A$1" & ":$D$" & i).AutoFilter Field:=3, Criteria1:="LUX"
Range("B3").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Application.CutCopyMode = False
Selection.Copy
Range("G3").Select
ActiveSheet.Paste
Range("M3").Select
ActiveSheet.Range("$A$1" & ":$D$" & i).AutoFilter Field:=3
Application.CutCopyMode = False
Selection.AutoFilter
Range("F3:G3").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Range("I3").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = ""
Range("I3").Select
End Sub

```